UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1941-1942 N° 304

Microdosage du Cholestérol par Oxydation Chromique du Complexe Cholestérol-Digitonoside

---

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 25 juillet 1942
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg
(Mention Pharmacie)

par

WEISKOPF Henri
Pharmacien
Lauréat de la Faculté en 1941

Examinateurs de la Thèse :
M. P. CORDIER, Professeur, Président.
M. A. SARTORY, Doyen.
M. Ch. LAPP, Professeur.
M. L. THIVOLLE, Professeur.
} Juges.

CLERMONT-FERRAND
IMPRIMERIE MODERNE, 15, RUE DU PORT
—
1942

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1941-1942 N° 304

Microdosage du Cholestérol par Oxydation Chromique du Complexe Cholestérol-Digitonoside

---

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 25 juillet 1942
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg
(Mention Pharmacie)

par

WEISKOPF Henri
Pharmacien
Lauréat de la Faculté en 1941

Examinateurs de la Thèse :
M. P. CORDIER, Professeur, Président.
M. A. SARTORY, Doyen.
M. Ch. LAPP, Professeur.
M. L. THIVOLLE, Professeur.
} Juges.

CLERMONT-FERRAND
IMPRIMERIE MODERNE, 15, RUE DU PORT
—
1942

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ⁂, C. ✺
VOLMAR, *Assesseur*, I. ⁂.
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ⚷, ⁂, ⁂.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ⁂, ✺.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ⁂, C. ✺	Bactériologie.
	LAVIALLE, ✻, I. ⁂, ✺	Botanique.
	VOLMAR, I. ⁂	Chimie organique.
	GUILLAUME, ✻, ⚷, I. ⁂, ✺ ..	Pharmacie galénique.
	LAPP, I. ⁂	Chimie analytique.
	CORDIER, ⁂	Pharmacie chimique.
	R. SARTORY, ⁂, ✺	Matière médicale.

MAITRE DE CONFERENCE

M. DUQUENOIS ..... Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ⁂, ✺.

COURS COMPLEMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène.
	LAVIALLE	Hydrologie.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	GUILLAUME	Zoologie.
	LAPP	Physique.
	PRELOT	Législation et Déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.
	Mme LALLEMAND, ⁂	Pharmacodynamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, ⚷, I. ⁂	Chimie pharmaceutique.
	Mme LALLEMAND, ⁂	Chimie et Physique.
	JÆGER	Histoire naturelle.
	LEDOUX	Bactériologie et Parasitologie.

UNIVERSITE DE CLERMONT

ECOLE DE PLEIN EXERCICE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DIRECTEUR

M. J. CASTAIGNE, C. ✻, I. ⁂ ... Membre associé national de l'Académie de Médecine.

SECTION DE PHARMACIE

PROFESSEURS

MM. L. BERT, I. ⁂ ..... Chimie biologique.
Mme L. BLANQUET, ✻, I. ⁂ ..... Physique.
MM. P. FEBVRE, ⁂ ..... Pharmacie galénique.
J.-B. FOURNIER, I. ⁂ ..... Matière médicale.
M. D. GAUTHIER, I. ⁂ ..... Chimie.
M. LEVADOUX, O. ✻, I. ⁂ .. Hydrologie.
P. MORNAC, I. ⁂ ..... Bactériologie et Hygiène.
R. VAURS, ⁂ ..... Zoologie et Parasitologie.

PROFESSEUR SUPPLEANT

M. G. DASTUGUE ..... Histoire naturelle.

COURS COMPLEMENTAIRE

MM. P. FEBVRE ..... Pharmacie chimique.
D. GAUTHIER ..... Chimie minérale.
LESCŒUR ..... Toxicologie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEAU, ⁂ ..... Physique.
DORIER, ⁂ ..... Chimie biologique.
VERGNE, I. ⁂ ..... Micrographie.

SECRETAIRE

M. G. CUVIER, I. ⁂.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CORDIER

PROFESSEUR DE PHARMACIE CHIMIQUE
ET DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.
Respectueux hommage.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR SARTORY

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

PROFESSEUR DE BACTÉRIOLOGIE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ

DE STRASBOURG

COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHARLES LAPP

PROFESSEUR DE CHIMIE ANALYTIQUE ET DE TOXICOLOGIE

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE PHYSICO-CHIMIE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Hommage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. THIVOLLE

PROFESSEUR AGRÉGÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Qui non seulement nous a inspiré le sujet de cette thèse, mais qui nous a constamment dirigé et guidé au cours de son élaboration, témoignage de notre vive et respectueuse reconnaissance.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant d'être membre de notre jury de soutenance de thèse.

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHAUMERLIAC

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE CLERMONT-FERRAND

Qui a bien voulu nous accepter comme aide technique dans son laboratoire.

En gage de notre reconnaissance.

A MA MERE

A MON PERE

Auxquels je dois tout.
Je leur dédie cette thèse, faible témoignage de mon affection filiale.

A MES AMIS

AVANT PROPOS

Avant d'entrer dans l'exposé de notre travail qu'il nous soit permis d'exprimer notre profonde gratitude à Monsieur le professeur CORDIER, professeur de chimie biologique et de pharmacie chimique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter la présidence de notre jury de thèse.

Nos remerciements les plus sincères vont également à Monsieur le professeur SARTORY, doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et à Monsieur le professeur LAPP, professeur de chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui nous ont fait le grand honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous adressons ici à notre maître, le docteur L. THIVOLLE, professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg, tous nos remerciements pour l'honneur qu'il nous a fait de bien vouloir nous accepter dans son laboratoire de l'Institut de chimie biologique replié à Clermont-Ferrand.

Pendant toute la durée de notre travail notre maître nous a constamment témoigné la plus haute bienveillance et la plus vive sympathie. Il n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés et ses encouragements grâce auxquels il nous a été possible de mener à bien cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de notre grande admiration et de notre entière reconnaissance.

Nous tenons enfin à remercier tous nos maîtres de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour le précieux enseignement qu'ils nous ont donné.

INTRODUCTION

Le cholestérol dans le sang

Les lipides du sang peuvent être divisés en deux groupes :

a) Les lipides ternaires parmi lesquels nous trouvons les glycérides constitués par des esters du glycérol, c'est-à-dire les graisses ordinaires des stérides dans lesquels l'alcool esterifié est un stérol.

b) Les lipides complexes tels que les phospholipides renfermant du phosphore sous forme de radical phosphorique et des glycérophosphoaminolipides comprenant un groupement aminé et dont l'alcool estérifié est le glycérol (lécithines).

C'est dans le premier groupe que nous trouvons le cholestérol. Alcool terpénique $C^{21}H^{48}O + H^2O$ susceptible de donner des esters c'est en effet surtout sous cette forme et en moindres proportions à l'état libre que nous trouvons le cholestérol presque dans tous les tissus de l'organisme.

La teneur normale d'un sérum ou d'un plasma étant de 1,50 gr. chez l'homme, 1,80 gr. chez la femme par litre nous trouvons 20 à 30 p. 100 de cholestérol à l'état libre,

le reste estérifié par les acides palmitiques et oléiques. Le cholestérol globulaire par contre serait entièrement à l'état libre.

L'origine du cholestérol est double :

a) Exogène par apport alimentaire.

b) Endogène par un processus d'élaboration complexe et mal connu auquel participent les capsules surrénales, le foi, le corps jaune de l'ovaire.

Bien que les proportions de cholestérol libre et estérifié soient sujettes à des variations qu'il peut être intéressantes de connaître c'est surtout le cholestérol total qui présente le plus grand intérêt en clinique.

En effet sa teneur augmente dans l'artériosclérose les néphrites, le diabète (notamment au cours de l'acidose) dans l'ictère par obstruction (jusqu'à 8 gr. par litre avec augmentation du cholestérol libre) dans certains cas de lithiase biliaire. Dans la grossesse l'hypercholestérinémie s'installe dès le deuxième mois et augmente jusqu'à l'accouchement pour disparaître ensuite. Chez les personnes âgées on remarque également une certaine hypercholestérinémie.

L'hypocholestérinémie accompagne certaines infections graves pour s'atténuer lorsque la fièvre disparaît.

Comme nous venons de le voir, le taux de cholestérol sanguin est sujet à des variations tantôt notables tantôt faibles qu'il est utile de connaître.

Différentes techniques de dosage ont été élaborées. Dans le domaine microanalytique des méthodes également nombreuses furent proposées. Mais la précision que l'on peut en espérer ne nous semblait pas en rapport avec les complications des techniques. Une méthode vraiment simple et sûre permettant de travailler vraiment à l'échelle microanalytique nous semblait intéressante.

C'est sur l'instigation de notre maître le professeur THIVOLLE qui nous a proposé ce sujet et guidé dans notre travail que nous avons entrepris des recherches dans ce sens.

Notre but a été de réaliser un microdosage pour des quantités de cholestérol allant de 0,25 à 2,00 mg. de cholestérol.

Ce travail constituant surtout un travail de laboratoire nous avons à dessein limité dans notre exposé la partie bibliographique pour nous étendre plus longuement sur la partie technique.

CHAPITRE I

LES MÉTHODES GÉNÉRALES DE DOSAGE DU CHOLESTÉROL

Deux types de méthodes assez différents ont été préconisés jusqu'à ce jour pour doser le cholestérol.

A. — LES DOSAGES COLORIMETRIQUES

PRINCIPE. — L'intensité de la teinte donnée par le cholestérol soumis à une réaction colorée bien déterminée est comparée à un étalon de cholestérol traité de façon identique. On peut opérer soit par comparaison directe à l'œil nu en faisant des dilutions convenables pour avoir l'égalité des teintes et en tenant compte de ces dilutions, soit en se servant d'un colorimètre.

Les deux réactions colorées du cholestérol qui se sont avérées satisfaisantes pour des dosages colorimétriques sont :

a) *La réaction de LIEBERMANN.* — Le cholestérol en solution chloroformique est traité par de l'anhydride

acétique et de l'acide sulfurique en proportions bien déterminées. On obtient une teinte verte qui atteint son maximum d'intensité entre 30 et 45 minutes après le début de la réaction.

C'est la réaction colorée du cholestérol la plus couramment employée.

b) *La réaction de TSCHUGAEFF.* — Le cholestérol est dissous dans un mélange d'acide acétique de CH^3COCL et de CL^2ZN. La coloration d'abord rose ou rouge devient d'un jaune verdâtre fluorescent.

Méthode de Grigaut

L'extrait lipidique de sérum est mis en solution dans du chloroforme.

On pratique la réaction de LIEBERMANN. On dose par comparaison à un étalon de titre connu soit 0,06 gr. de cholestérol pour 100 cm^3 de chloroforme. C'est la méthode la plus couramment employée.

Méthode de Paget-Pierrart [1]

Les deux auteurs font la réaction de LIEBERMANN non plus en solution chloroformique mais en solution trichloréthylénique. Ce solvant permet à la fois le dosage colorimétrique et la précipitation du complexe cholestérol digitonoside. La méthode est spécialement conçue pour doser le cholestérol sous ses deux formes dans un même échantillon. Un dosage colorimétrique donne le chiffre de cholestérol total. On élimine le cholestérol libre par précipitation à chaud avec la digitonine dans un solvant constitué par un mélange d'éthanol, de méthanol et de trichloréthylène. Par filtration le cholestérol libre engagé dans le complexe est éliminé. Un deuxième dosage colorimétrique sur le filtrat permet de connaître la quantité de cholestérol estérifié.

Méthode de Mildbradt [2]

C'est une micro méthode permettant le dosage du cholestérol sur une goutte de sang. L'extraction se fait après hémolyse par dilution aqueuse à l'aide d'un mélange éther alcool. On saponifie. Le cholestérol extrait au chloroforme est dosé colorimétriquement par la réaction de TSCHUGAEFF après une demi heure au bain marie.

B. — LES DOSAGES PAR LE COMPLEXE CHOLESTEROL DIGITONINE

PRINCIPE. — WINDAUS [3], en 1910, découvre la propriété de la digitonine de se combiner à chaud, molécule à molécule, au cholestérol libre en mettant en présence les deux produits dissous dans l'alcool. Le complexe insoluble précipite et ce fait devait être à l'origine d'une série de techniques de dosages pondéraux.

Tout revient à avoir une bonne méthode de précipitation du complexe, la pesée ne constituant pas une difficulté surtout dans le cas d'un macrodosage.

La pesée plus délicate à l'échelle microanalytique peut être remplacée avantageusement par le dosage chromométrique du complexe et nous passons ainsi de la gravimétrie à la volumétrie.

Nous pouvons donc diviser les techniques de dosage du cholestérol par le complexe cholestérol digitonine en deux catégories :

a) *Les dosages pondéraux.*

b) *Les dosages volumétriques.*

a) Les dosages pondéraux

Méthode pondérale de Windaus

On ne trouve plus guère dans les manuels de chimie biologique la technique primitive de WINDAUS. La précipitation par cette méthode est fort longue et incomplète. Elle a plutôt un intérêt théorique puisqu'elle est la première application à un dosage de la découverte de WINDAUS.

La précipitation se fait à chaud en solution alcoolique. Le digitonoside en solution dans l'alcool absolu est mis au contact de la solution de cholestérol dans l'alcool. On porte à ébullition. On abaisse le degré alcoolique par addition d'eau. La précipitation est longue à se faire et n'est pas totale.

Si les techniques de dosage colorimétrique et en particulier la technique primitive de GRIGAUT ont connu peu de perfectionnements il n'en est pas de même des dosages par le complexe. Les chercheurs qui se sont occupés de cette question se sont attachés à trouver un solvant stable de la digitonine, une technique permettant une précipitation totale, des solutions de lavage du complexe permettant de le purifier sans perte par dissolution en éliminant les impuretés et l'excès de digitonine.

Ces méthodes seront examinées en détail plus loin.

b) Les dosages volumétriques

Ils mettent à profit la formation du complexe cholestérol digitonine et ne sont en réalité que des méthodes dérivées des dosages pondéraux en ce sens que seule la technique de la détermination de la quantité de complexe diffère. Si l'on dispose d'une bonne méthode de précipitation et de lavage du complexe on l'oxyde par un mélange sulfochromique en excès. Du volume de mélange

sulfochromique initialement mis en œuvre on déduit la quantité de complexe qui a été oxydée.

CRITIQUE DES DIVERS TYPES DE DOSAGES

Le dosage colorimétrique

Il est certainement le plus couramment pratiqué en raison de sa simplicité. La réaction de LIEBERMANN se faisant aussi bien sur le cholestérol libre ou estérifié, on évite ainsi une saponification de longue durée. Cet avantage permettant un dosage assez rapide à contribué au succès de la méthode.

On peut toutefois reprocher à la méthode l'imprécision inhérente à tous les dosages colorimétriques. D'ailleurs il est indispensable de prendre des précautions diverses pour opérer dans les meilleures conditions et DOURIS [3] recommande pour « obtenir des résultats exacts avec une erreur de moins de 5 p. 100 » d'employer des tubes ne présentant pas de traces apparentes d'humidité. Il s'agit en outre de faire les réactions colorées sur la solution de cholestérol à titrer et sur l'étalon aussi simultanément que possible.

Il est recommandé de mesurer l'acide sulfurique avec le même compte-gouttes pour tous les dosages.

La durée joue un très grand rôle dans l'évolution de la teinte et même pendant l'observation au colorimètre cette teinte peut varier. Certains auteurs recommandent de laisser la teinte se développer à l'obscurité à une température déterminée.

Dans les cas de sérum ou de plasma fortement colorés (ictériques) l'opérateur est fort gêné par la différence de teinte existant entre l'échantillon à doser et l'étalon. On ne peut donc trouver l'égalité d'intensité entre deux teintes de qualités différentes.

Fleury [5] remédie à cet inconvénient en remplaçant la lumière naturelle par celle d'une lampe électrique monowatt dépolie soit en se servant d'un comparateur utilisé pour la détermination colorimétrique du PH et compensant le jaune du tube de sérum en mettant derrière l'étalon un tube à essai rempli d'une solution de rouge de méthyle en milieu alcalin.

Comme nous venons de le voir la colorimétrie du cholestérol est en réalité assez délicate et la précision obtenue dans les meilleures conditions techniques n'est que de 5 p. 100.

La précision que l'on peut espérer n'est donc pas en rapport avec les complications introduites, surtout dans le cas d'un sérum anormalement coloré.

Lifschutz [6] a montré qu'il existe à côté du cholestérol un groupe de corps qui donnent également la réaction de *Liebermann*.

Le clinicien désirant connaître un chiffre de cholestérol total peut éventuellement se contenter d'un dosage colorimétrique. Mais ces dosages sont d'une précision insuffisante dès que l'on dépasse le cadre des dosages cliniques.

Il en résulte qu'en principe seules les méthodes par précipitation à la digitonine peuvent donner des chiffres réels.

Le dosage pondéral

A condition d'avoir une bonne technique d'isolement du complexe cholestérol-digitonoside, on peut attendre des méthodes de dosage pondéral une précision bien supérieure à celle que peut fournir la colorimétrie. Nous verrons cependant, dans cette étude, que la précipitation et le lavage du complexe n'ont pas toujours pu être réalisés de façon tout à fait satisfaisante. La multiplicité des techniques proposées en fait foi.

Pour ce qui nous intéresse, c'est-à-dire le microdosage, on peut affirmer qu'il n'a pu toujours être abordé dans les conditions les meilleures. En effet, la pesée devient, surtout si l'on veut aborder les quantités de cholestérol inférieures au milligramme, une opération très délicate et qui nécessite l'emploi d'une microbalance. Lorsque nous nous proposons par exemple de doser par précipitation un milligramme de cholestérol, nous obtenons 4 mgr. de complexe. Si nous cherchons une meilleure approximation qu'en colorimétrie, c'est-à-dire 1 à 2 pour 100, par exemple, nous devons peser le complexe à 0 mg. 04 près. Dans ces conditions, une balance au 1/100e ou au 1/1000e de mg. devient donc indispensable. Or une balance sensible au 1/1000e de mg. n'est pas à la portée de chaque laboratoire et la micropesée est longue.

La chromométrie doit résoudre le problème d'une façon satisfaisante et à l'échelle micro-analytique doit permettre d'atteindre une précision du même ordre que celle des meilleurs méthodes proposées jusqu'à présent.

Bang [7], Szent-Gyorgyi [8], Kayser et Mathieu [9] ont réalisé l'oxydation chromique du complexe obtenu dans les conditions habituelles des méthodes pondérales. Le microprécipité obtenu à chaud est oxydé sur un filtre spécial après transvasement. Leurs techniques nécessitent en général un matériel peu courant et ne nous semblent pas sans défaut. Nous les examinerons dans les chapitres suivants.

Nous disposons d'une méthode chromométrique simple n'exigeant aucun matériel spécial et qui nous permet de travailler véritablement à l'échelle microanalytique. Nous avons voulu généraliser son emploi, et, au prix de quelques perfectionnements de technique, nous avons pu réaliser un procédé commode sans sacrifier la précision.

Nous allons étudier successivement :

I. — La technique que nous employons pour tous nos microdosages chromométriques.

II. — La chromométrie du complexe cholestérol-digitonine.

III. — Les différentes méthodes de précipitation proposées jusqu'à ce jour. Les remarques des auteurs et les remarques personnelles qui nous ont guidées dans la mise au point d'une technique nouvelle, applicable à des quantités de cholestérol inférieures au milligramme.

IV. — La valeur de quelques méthodes d'extraction du cholestérol dans le sang.

V. — La réalisation pratique d'un dosage.

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMOMÉTRIE

L'oxydation chromique a suscité depuis près d'un siècle un très grand nombre de travaux. Nous en trouvons dans le domaine analytique et en particulier en chimie organique des applications très intéressantes.

Une des plus précieuses est certainement l'oxydation chromique en tant que technique de dosage des matières organiques.

Principe de la méthode

Une certaine quantité de bichromate de potassium en solution est mis au contact de la matière organique. Dans des conditions bien déterminées de concentration, d'acidité et de température le bichromate est réduit. La quantité de bichromate réduite est proportionnelle à la quantité de matière organique en contact.

Deux méthodes de titrage par volumétrie sont possibles :

1° Le titrage du bichromate réduit.

2° Le titrage du bichromate non réduit.

Nous pouvons donc dire d'une façon générale que la chromométrie en tant que méthode de dosage est l'ensemble des méthodes volumétriques de dosage indirect des substances oxydables basées sur l'évaluation de la quantité de bichromate réduit à leur contact.

Conditions à remplir pour un dosage chromométrique

Des procédés très divers ont été proposés mais toujours faut-il tenir compte du fait que tout phénomène d'oxydation est sous la dépendance de deux facteurs principaux.

La puissance de l'oxydant employé.

L'oxydabilité de la substance traitée.

C'est ainsi que pour un oxydant déterminé dans des conditions d'acidité, de température, de concentration et de durée définies pour un corps chimique connu, l'oxydation doit toujours atteindre le même stade.

Ce stade est traduit par une équation d'oxydation exactement définie qui conditionne et garantit un dosage chromométrique correct. Il est utile de choisir un terme d'oxydation stable afin que dans des conditions toujours identiques le degré d'oxydation soit toujours le même.

Du point de vue chromométrique on peut diviser les corps organiques en deux catégories à savoir.

a) Ceux dont l'oxydation est totale c'est-à-dire dont le terme ultime de la combustion est CO^2 et H^2O (exemple : glycérine).

b) Ceux dont l'oxydation s'arrête au stade acide acétique avec ou sans production de CO^2 (exemple : alcool éthylique).

Pureté de l'échantillon à doser

Comme l'oxydation chromique n'est pas élective un dosage par cette méthode n'est possible que si le corps

à doser a été préalablement isolé et purifié. Ceci est d'autant plus indispensable dans les liquides biologiques ou les éléments sont souvent intimement liés entre eux. L'isolement et la purification préalable constituent dans un dosage chromométrique un problème assez délicat qui en a souvent réduit les possibilités.

Application en chimie biologique

Nombreuses sont cependant les applications qui sont à l'heure actuelle passées dans la pratique courante des laboratoires. Les dosages de l'urée, de l'alcool éthylique du glycérol de la sérine et de la globuline sont de celles-là. D'autres applications fort nombreuses demandent à être mises au point.

La chromométrie n'est cependant pas exclusivement réservée au dosage des matières organiques et en principe tout corps réducteur, même minéral peut être ainsi dosé. C'est le cas par exemple du microdosage du potassium par oxydation chromique du cobaltinitrite.

TECHNIQUE DE LA CHROMOMETRIE

Solutions oxydantes employées

On emploie en général des solutions titrées de bichromate de métaux alcalins habituellement normales, demi normales ou décinormales renfermant respectivement par litre un demi, un quart ou un vingtième d'atome d'oxygène cessible et des solutions réductrices de titre correspondant.

Exceptionnellement des solutions de chromate d'argent ont été employées. Elles permettent une oxydation plus puissante mais introduisent une complication dans le dosage. Dans le cas du titrage par iodométrie l'argent doit être éliminé par le chlorure de sodium. Par chro-

mométrie directe à l'aide du Ferrocyanure, l'argent gêne le virage de l'indicateur coloré employé : la diphénylbenzidine.

Voyons les réactifs chromiques les plus intéressants par leur pouvoir oxydant et leur stabilité.

CORDEBARD [10] signale en 1922, dans un travail intitulé : « *Vérification de la pureté et titrage des composés organiques complètement oxydés par le mélange chromique* », les possibilités du mélange sulfochromique à 50 p. 100 d'acide sulfurique. Dans un intéressant ouvrage : « *L'oxydation chromique en analyse quantitative* », en 1940, ce même auteur souligne l'intérêt des solutions nitrochromiques qui peuvent être très concentrées en raison de la grande solubilité des chromates dans l'acide nitrique.

Réactif nitrochromique

Préparation : On dissout 49 gr. par litre (pour une solution normale) de bichromate de potasse dans l'acide nitrique concentré (d 1,38), bouilli ou simplement aéré pour chasser les vapeurs nitreuses. Le réactif ainsi préparé, d'une stabilité remarquable, supporte l'ébullition et même l'évaporation de la totalité de l'acide nitrique sans réduction de bichromate.

THIVOLLE et SONNTAG utilisent le mélange nitrochromique pour le dosage de l'alcool, du glycérol, du potassium.

Les deux auteurs constatent qu'il ne convient pas pour l'oxydation des substances à noyau aromatique et proposent un réactif sulfochromique stable.

Réactif sulfochromique

Pour le préparer, il est indispensable d'employer un acide sulfurique absolument pur n'ayant aucun pouvoir réducteur. Un acide du commerce « pur » ne peut

convenir et les auteurs proposent une manière simple et efficace de le purifier par ébullition avec 2 à 3 p. 100 de perhydrol jusqu'à apparition de vapeurs blanches. Après refroidissement, on dispose d'un acide exempt de matières organiques et de H^2O^2 en excès. Il est recommandé d'en préparer peu à l'avance et de le conserver soigneusement à l'abri de toutes les impuretés (poussières, etc.).

Préparation de la solution sulfochromique N/2 (50 p. 100 d'acide sulfurique).

Le bichromate de potassium (24 gr. 5 par litre) purifié par recristallisation et ayant séjourné quelque temps à l'exsicateur est mis en solution dans l'eau distillée. La dissolution ne devient complète qu'après addition d'un volume égal d'acide sulfurique par échauffement du milieu (limite de solubilité).

Le réactif ainsi préparé est stable à l'ébullition à condition de ne pas amener une concentration trop forte en acide sulfurique.

Dans la plupart des cas, à la condition d'élever le titre en acide sulfurique au voisinage de 70 p. 100 en volume par adjonction d'acide sulfurique purifié au dosage on pourra réaliser des oxydations au maximum à la température du bain marie bouillant sans risque d'autoréduction. Notons cependant que nous avons eu à plusieurs reprises livraisons d'acide sulfurique impossible à purifier totalement par la technique de Thivolle et Sonntag. Cet acide incolore devait renfermer un peroxyde ne s'éliminant pas par H^2O^2 à l'ébullition et responsable de la réduction d'une certaine quantité de bichromate. Dans ce cas, il y a une certaine correction à blanc difficile à éviter. Nous indiquerons, le moment venu, le moyen d'en tenir compte. Nous signalons cet inconvénient éventuel qui, une fois le titre connu, ne peut avoir aucune répercussion sur la précision du dosage.

TITRAGES DES SOLUTIONS CHROMIQUES

Généralités

La chromométrie doit se terminer par le titrage du bichromate non attaqué dans les opérations d'oxydation. En toute rigueur, il doit également commencer par le titrage de la quantité de bichromate mise en œuvre dans une opération. C'est donc le point de vue très général du dosage du bichromate en solution très acide que nous devons envisager.

Les méthodes utilisées sont de deux types.

Les unes que l'on pourrait appeler du type indirect consistent à passer par l'intermédiaire de la manganimétrie ou de l'iodométrie avec emploi de liqueurs titrées réductrices qui seront respectivement le sulfate ferreux ou l'hyposulfite.

Les autres consistent à faire réagir directement sur le bichromate un réducteur dont il faut pouvoir apprécier l'excès.

H. Cordebard utilise le sulfate ferreux et un indicateur externe, le ferricyanure de potassium. Cette technique, qui avait paru d'un emploi très commode n'est pas véritablement microanalytique. Nous lui préférons la méthode proposée par Thivolle et Sonntag [11] utilisant le ferrocyanure comme réducteur et la diphénylbenzidine comme indicateur interne.

Valeur de ces différentes méthodes de dosage du bichromate non réduit

En 1939 THIVOLLE et SONNTAG préconisent le titrage direct par le ferrocyanure de potassium. C'est cette méthode que nous avons employé pour tous nos dosages. Nous la résumerons donc dans ses grandes lignes.

Citons l'introduction à l'exposé de ces deux auteurs qui est le principe de leur méthode :

« Utilisant le diphénylamine, ou mieux encore la « diphénybenzidine comme indicateur et des solutions « N/200 de ferrocyanure comme réducteur on peut directement doser le bichromate de potassium en milieu très « acide. A l'échelle micro analytique ce titrage exige « certaines précautions qui sont cependant très simples « et qui permettent d'atteindre une précision de même « ordre que celle des meilleurs méthodes proposée jusqu'à présent ».

Les auteurs après avoir attiré l'attention sur les nombreux avantages de la chromométrie dans les microdosages (emploi du bichromate de potassium comme agent d'oxydation très précieux, très maniable puisque sel anhydre et se prêtant fort bien à la préparation de solutions stables) font remarquer que la chromométrie a vu ses applications limitées par la difficulté de mise en évidence de la fin de la réaction si l'on opère par voie directe, difficultés qui se retrouvent si l'on opère indirectement en dosant l'excès de bichromate laissé libre après l'oxydation.

Ils examinent ensuite rapidement les techniques qui ont été préconisées dans l'un et l'autre cas.

CRITIQUE DE LA CHROMOMETRIE DIRECTE

NICLOUX [12] dans sa première méthode de dosage de l'alcool éthylique note la réduction de quantités progressives de bichromate ajouté à la solution alcoolique addi-

tionnée d'acide sulfurique dont la couleur passe du jaune au bleu tant qu'il n'y a pas excès de réactif.

La persistance de la coloration vert jaunâtre du mélange indique la fin de la réaction.

La précision n'est pas supérieure à 5 p. 100 comme l'auteur lui-même l'a affirmé.

Ionesco Mattu et C. Popesco [13] utilisent comme indicateur externe une solution de bleu de méthylène réduit qui se recolore par le bichromate dès qu'il est en excès. Ce procédé n'est guère plus précis.

CRITIQUE DE LA CHROMOMETRIE INDIRECTE

Polonowski [14] utilise l'iodométrie, peut être satisfaisante comme macro méthode, mais imprécise à l'échelle micro analytique en raison de l'instabilité des solutions très diluées d'hyposulfite de soude servant à titrer l'iode libéré.

L'iodométrie ainsi pratiquée présente d'autres inconvénients en particulier la fixation de l'iode sur certaines substances qui ont pu résister à l'oxydation et dont Polonowki et ses élèves ont fait une étude.

H. Cordebard emploie le sulfate ferreux avec le ferricyanure de potassium comme indicateur externe. Peu sensible ce procédé n'est pas intéressant pour une microméthode.

Nicloux réduit délibérément tout le bichromate en ménageant un petit excès de sulfate ferreux lui-même dosé par maganimétrie. Cette méthode excellente en elle-même n'est pas d'une application générale.

La chromométrie directe de Thivolle et Sonntag

Thivolle et Sonntag proposent enfin un indicateur interne, la diphénylamine qui semble très couramment employée en Amérique dans les dosages du chrome des aciers en chimie industrielle.

La diphénylamine en solution acide vire au violet avec une goutte de bichromate de potassium N/10 avec une extrême facilité. C'est donc un indicateur très sensible.

Les auteurs utilisent le virage par décoloration qui :

1° Permet une véritable chromométrie directe.

2° Evite à coup sûr les réactions parasites signalées dans les autres méthodes (iodométrie en particulier).

Choix d'un réducteur

Les mêmes auteurs proposent une solution N/200 de ferrocyanure de potassium qui présente sur tous les autres réducteurs de nombreux avantages. Cette solution est très stable surtout si on prend la précaution d'alcaniser très légèrement la solution stock qui servira à préparer les dilution N/80 au moment de l'emploi.

Préparation de la solution de ferrocyanure

Solution stock.

On pèsera 217,50 gr. de ferrocyanure recristallisé pour 1 litre de solution stock que l'on alcalinisera par 2 à 3 grammes de soude pure qui favorisera la conservation. La solution est filtrée sur amiante et conservée à l'abri de la lumière. Elle servira à faire les solutions N/80 que nous utiliserons dans le cas présent. On prendra 25 cm^3 de cette solution stock pour faire 1 litre de solution N/80.

VIRAGE AVEC LA DIPHENYLBENZIDINE

La coloration évolue d'abord lentement du violet bleu vers une teinte plus chargée en rouge, mais de même intensité. Puis lorsqu'on est très près du virage, chaque nouvelle goutte de ferrocyanure fait baisser la teinte de moitié. En examinant la lumière réfléchie par le fond du récipient dans lequel se fait la réaction, on

voit s'éteindre le reflet vineux qui fait place à une couleur jaune verdâtre d'autant plus pure qu'il y avait moins de bichromate en excès à doser.

En pratique, il est recommandé de ne pas avoir à titrer plus de 2 ou 3 cc de bichromate N/10 précaution qu'il est facile de prendre dans un microdosage (ceci est le cas pour tous nos dosages).

La quantité optima de diphénylbenzidine par dosage est de 0 cc. 4 de ce réactif en solution à 1 pour 1000 dans l'acide sulfurique à 70° pour 100 en volume.

Le virage est d'une grande netteté, surtout pour les petites quantités, perceptible même avec un mauvais éclairage. Il est même recommandé d'éviter une lumière trop vive et trop directe. Utiliser 0,4 cm^3 pour 2 cm^3 d'acide dans le milieu. Respecter cette proportion en doublant la quantité de réactif colorant si l'oxydation chromique à nécessité un plus grand volume d'acide.

Voici la préparation de la diphénylbenzidine telle qu'elle est décrite par MARQUEYROL et MURAOUR.

« On prépare un mélange de 50cc. d'acide sulfurique à 66° et 150 cc d'eau dans lequel on verse après refroidissement, une dissolution de 8 gr. de diphénylamine dans 20 cc d'acide acétique. On introduit alors en agitant une dissolution de 4 gr. 7 de bichromate de soude dans 200 cc d'eau et 29 cc d'acide sulfurique au quart.

« La température s'élève rapidement (de 13 à 27°), on continu à agiter pendant 5 minutes. On verse alors le liquide dans un ballon de 2 litres contenant 100 cc de bisulfite de soude à 27° Bé et 400 cc d'eau. Il se forme un précipité vert foncé. On chauffe au bain-marie jusqu'au moment où le précipité devient clair (vers 60-70°).

« On laisse refroidir, on filtre, on lave à l'eau puis à l'alcool pour éliminer les traces de diphénylamine qui ont pu échapper à l'oxydation.

« Le produit sèché est repris par le toluène à l'ébullition. On filtre à chaud, par refroidissement la diphénylbenzidine cristallisée (rendement 60 %).

SOLUTIONS EMPLOYEES POUR NOS DOSAGES

Mélange sulfochromique

Nous avons utilisé comme mélange oxydant une solution sulfochromique N/2 à 50 % d'acide sulfurique pur.

(Voir préparation page 31)

Solution de ferrocyanure

Nous avons utilisé une solution N/80.

(Voir page 35)

C. — *Solution de diphénylbenzidine*

On pèsera envire 0,1 gr. de ce produit qui sera dissout par agitation à froid dans 70 cc d'acide sulfurique concentré et purifié. Ajouter 30 cc d'eau avec précaution.

Titres des solutions

Nous avons pris comme étalon une solution aqueuse de bichromate de potassium N/5 conservée à l'abri de la lumière, dont la stabilité est très satisfaisante. Le ferrocyanure est titré par rapport à cette dernière (le titrage se fait en présence de Icc SO^4H^2). Le titre du mélange sulfochromique sera déterminé par rapport à la solution de ferrocyanure.

Soit un exemple pratique.

Nous disposons :

a) D'une solution étalon de bichromate N/5.

b) D'une solution de ferrocyanure N/80 à vérifier.

c) D'une solution de mélange sulfochromique N/2, à vérifier.

Il s'agit à partir de l'étalon de déterminer le titre exact du ferrocyanure et celui du mélange sulfochromique.

Titrons 2 cm³ de bichromate étalon en présence de 1 cm³ d'acide sulfurique pur, 30 à 40 cm³ d'eau et 0,40 de diphénylbenzidine. Il faut par exemple 30,30 de ferrocyanure pour atteindre le virage chromique N/2.

$$\frac{30{,}30 \times 5}{4} = 37{,}90 \text{ de ferrocyanure N/80 (titre N')}$$

Avec cette solution de titre N' nous titrons le mélange sulfochromique dans les mêmes conditions.

Il faudra par exemple 35,70 de ferrocyanure N/80 (N) Le titre exact du mélange sulfochromique N/2 sera N/N' soit

$$\frac{35{,}70}{37{,}90} = 0{,}941 \text{ dans le cas pratique admis.}$$

REALISATION PRATIQUE D'UN DOSAGE CHROMOMETRIQUE SELON LA METHODE THIVOLLE-SONNTAG

Le mélange chromique après oxydation est transvasé quantitativement (3 lavages) dans une fiole conique de 150 cm³. S'arranger pour que le volume soit de 30 à 40 cm³ permettant une perception optima du virage.

Ajouter la diphénylbenzidine.

Titrer jusqu'à la disparition de la teinte vineuse par le ferrocyanure avec une burette ordinaire.

Noter qu'il faut en principe pour 1 cm³ de mélange

sulfochromique et 1 cm^3 d'acide sulfurique concentré 0,4 cm^3 de diphénylbenzidine à 1 p. 1.000 et 30 à 40 cm^3 d'eau. Si la quantité de mélange chromique et d'acide sulfurique augmentent, augmenter la quantité d'indicateur et le volume d'eau pour respecter les proportions définies ci-dessus.

Calculs

a) Volume de mélange chromique non réduit. C'est le quotient du nombre de centimètres cubes de ferrocyanure par le titre du ferrocyanure.

b) Volume de mélange chromique réduit. C'est la différence entre le volume de mélange chromique initiallement mis en œuvre et le volume de mélange chromique non réduit.

Exemple numérique.

Dosage effectué avec 1 cm^3 de mélange chromique.
Titre du mélange chromique : 0,941.
Chute de burette en ferrocyanure : 23 cm^3.
Titre du ferrocyanure N/80 : 37,90.
Quantité de bichromate réduit :

$$0{,}941 - \left(\frac{23{,}00}{37{,}90}\right) = 0{,}618 \text{ cm}^3$$

QUELQUES GENERALITES SUR LE DOSAGE CHROMOMETRIQUE DES LIPIDES

« C'est le professeur suédois Ivar Bang [7] de l'Institut Médico-Chimique de Lund qui en 1918 donna le premier un « Procédé titrique de microdétermination des matières lipoïdiques par oxydation sulfochromique ».

La technique employée est assez simple. Il met le produit résultant de la saponification des graisses en contact avec une solution aqueuse titrée de $Cr^2O\ 7K^2$

en excès. Il ajoute ensuite une certaine quantité de SO^4H^2 pur. Le mélange qui s'échauffe spontanément par l'addition de l'acide est abandonné à lui-même pendant 15 minutes sans être ni réchauffé ni refroidi ce qui pourrait donner des « valeurs inexactes ». BANG ajoute ensuite une certaine quantité d'eau pour opérer à une concentration toujours sensiblement la même et après addition d'iodure de potassium, titre l'iode libéré par l'hyposulfite de soude décinormal.

Voyons les intéressantes conclusions formulées par le premier auteur de la chromométrie des lipides.

BANG spécifie bien que dans ces conditions, l'oxydation des graisses n'est pas complète, mais *suffisamment régulière* pour servir de base au dosage des lipides par comparaison avec une substance étalon. Il constate en outre que « l'acide chromique oxyde les graisses et les transforme en CO^2 et en acides gras plus simples. Un poids donné des graisses réduit une quantité proportionnelle d'acide chromique... La réduction se fait par simple mélange de solution aqueuse et d'acide sulfurique sans chauffage... La détermination titrimétrique consiste à doser l'acide chromique non réduit par iodométrie.

Les résultats signalés à la suite de nombreux essais correspondent en effet à des variations assez faibles dans les deux sens qui peuvent être attribuées à des erreurs d'ordre expérimental.

BANG appliqua sa méthode également au dosage des phosphatides et obtint des résultats satisfaisants. En opérant sur différentes graisses il constata que le coefficient de réduction était variable mais ne dépassait jamais 69 p. 100 dans les conditions décrites.

En conclusion nous pouvons donc dire que l'oxydation chromique des lipides est simple et donne dans la méthode de BANG des chiffres d'une régularité suffisante

avec une technique commode à condition toutefois d'être en présence d'un corps pur ou soigneusement isolé s'il a été extrait. Pourvu d'une bonne technique, mise au point avec des corps purs BANG constata que la *grande difficulté des dosages pratiques consistait plus dans l'isolement des graisses proprement dites* les valeurs étant seulement approximatives. En effet l'oxydation chromique n'est pas élective et l'isolement du corps à doser dans le cas d'un dosage liquide biologique est une condition essentielle pour la chromométrie.

CHAPITRE III

OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU COMPLEXE CHOLESTÉROL DIGITONOSIDE

Pour mieux connaître la chromométrie du complexe nous avons décomposé le problème en ses deux constituants et nous nous sommes proposés dans nos essais préliminaires de faire :

1° **La chromométrie du cholestérol pur ;**

2° **La chromométrie du digitonoside pur ;**

3° **La chromométrie du complexe.**

§ I. — OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU CHOLESTEROL

Les travaux antérieurs nous apprennent que l'oxydation totale du cholestérol est difficile à obtenir. Si nous nous reportons au travail de CORDEBARD (cf l'oxydation chromique en analyse quantative (1940) p. 331) nous relevons que BANG réalise une oxydation qui représente 62,3 p. 100 de celle que l'on peut calculer pour l'oxydation totale du cholestérol.

Schématiquement nous avons

$$C^{27}\ H^{46}O + 76O = 27\ CO^2 + 23\ H^2O$$

L'équation d'oxydation est telle que 1 mg de cholestérol réduit 3,93 cm^3 de bichromate N/10.

SZENT GYORGYI atteint 80 p. 100 alors que l'adjonction de bichromate d'argent permet à OKEY [23] et à YASUDA [24] d'améliorer le pourcentage d'oxydation jusqu'au chiffre de 89 p. 100.

Enfin en 1939 F. KAYSER et Cl. MATHIEU auraient obtenu l'oxydation totale en utilisant des solutions argento sulfochromique à 50 p. 100 d'acide sulfurique avec chauffage sous réfrigérant à reflux suivant la technique de CORDEBARD.

Dans nos recherches nous n'avons pas jugé utile de réaliser cette oxydation totale pour deux raisons.

1° L'ébullition avec réfrigérant à reflux exige un appareil rodé qu'il est malaisé de se procurer dans les circonstances actuelles.

2° Elle nécessite en outre un transvasement que nous voulions éviter pour conserver à la méthode son caractère de simplicité, souhaitable pour un dosage en série.

De plus l'emploi du chromate d'argent sans être incompatible avec la chromométrie directe de THIVOLLE et SONNTAG modifie un peu les conditions du virage au ferrocyanure et oblige à un étalonnage dans ces conditions spéciales. Encore faut-il que l'argent ne soit pas en grand excès.

Nous avons donc résolu de nous contenter d'une oxydation incomplète à la condition qu'elle soit régulière. Les conditions en quelque sorte standard utilisées par THIVOLLE et SONNTAG [11'] pour l'oxydation de la dixanthylurée nous semblaient pouvoir donner satisfaction. Elles se résument à l'emploi d'un mélange chromique $\frac{N}{2}$ — à environ 70 p. 100 d'acide sulfurique et un séjour au bain marie bouillant de 15 minutes. Les conditions sont telles que le pourcentage d'oxydation de l'acide acétique atteint à peine 1 p. 100.

CORDEBARD (l'oxydation chromique en analyse quantative p. 233) signale que :

« Pratiquement il est très difficile d'obtenir l'oxy-
« dation totale de l'acide acétique... Dans les conditions
« les plus favorables et pour une opération de durée
« moyenne le pourcentage d'oxydation complète de l'acide
« acétique en CO^2 et H^2O atteint à peine 1 p. 100 pour
« le mélange sulfochromique à 70 p. 100 le plus actif
« à la température du bain marie et 2 p. 100 avec le
« mélange sulfochromique à 50 p. 100 à l'ébullition ».

Seule l'action d'un mélange argento sulfochromique permet la combustion totale de l'acide acétique ainsi que SIMON l'a établi.

Ce fait serait à peine gênant dans le dosage de l'alcool éthylique qui transforme tout le carbone en acide acétique. Il ne doit présenter que peu d'inconvénients dans le cas du dosage du cholestérol qui ne

devrait donner d'après l'examen de sa formule de l'acide acétique que par les trois carbones 18, 19 et 21 des groupements méthyle fixés respectivement sur les carbones 13, 10 et 20 (Polonowski éléments de biochimie médicale p. 78).

La formule suivante rend compte de cette oxydation :

$$C^{27}H^{46} + 64O = 21\ CO^2 + 17\ H^2O + 3\ CH^3CO^2H$$

Cordebard en 1922 a formulé les lois qui président à la formation de l'acide acétique au cours de l'oxydation chromique.

« Il y a formation d'acide acétique :

« *a*) Si la substance renferme un groupement « CH^3C, ce dernier C étant le support d'une fonction « facilement oxydable en COOH.

« *b*) Si dans un corps de la série grasse un groupe- « ment CH^3 est relié directement, ou par l'intermédiaire « de CH^2 ou CH à des fonctions alcool, cétone, aldéhyde « ou acide.

« La formation d'acide acétique est plus rare dans « la série benzénique si le noyau est peu résistant. C'est « le cas des amines, phénols à chaîne latérales en CH^3 « (Toluidine, Crésol). Il ne se forme pas d'acide acétique « quand l'oxydation est difficile. »

La différence avec l'oxydation totale n'est pour la molécule que de 12 O. La production d'acide acétique représente donc $\frac{12}{64} \times 100 = 18{,}8$ p. 100 de l'oxydation que l'on réalise et l'erreur éventuelle de 1 p. 100 sur cette quantité 0,19 pour 100 sur la quantité de bichromate consommée.

D'autre part cette équation permet de calculer une consommation de 3,32 cm^3 de bichromate N/10 pour

1 mg de cholestérol ce qui représente 84,5 p. 100 de l'oxydation totale.

Ce coefficient n'avait pas été atteint par les auteurs qui n'utilisaient pas le bichromate d'argent comme catalyseur (80 p. 100) et pas tellement dépassé par l'emploi de ce réactif dans les conditions courantes (89 p. 100).

L'expérience nous a montré que nos prévisions étaient correctes. Voici comment nous avons opéré pour ces étalonnages :

On prépare une solution de cholestérol pur à 1 p. 1.000 dans l'alcool à 95° et on mesure des quantités variables dans une série de tubes à centrifugeuse cylindroconique, de petites dimensions et bien propres. On évapore l'alcool en plongeant ce tube dans un bain d'eau froide que l'on amène à l'ébullition. Après dessication le résidu de cholestérol est trituré à froid avec 1 cm^3 d'acide sulfurique concentré pur. Lorsque la dissolution est suffisante on ajoute 1 cm^3 de mélange sulfochromique N/2 à 50 p. 100 d'acide sulfurique. On porte au bain marie bouillant en agitant de temps en temps afin qu'aucune parcelle n'échappe à l'action oxydante du mélange. La dissolution préalable du cholestérol assure une attaque rapide et empêche qu'il se réunisse en petites gouttelettes huileuses qui restent collées au verre et qui s'oxydent difficilement.

Le tableau n° 1 résume nos résultats.

Si l'on fait la somme des quantités de bichromate utilisées (4e colonne) et celles de cholestérol mis en œuvre (1re colonne), on calcule la consommation moyenne de 3,504 cm^3 de bichromate N/2 pour 5,25 mg. de cholestérol :

soit 0,667 de bichromate N/2 pour 1 mg. de cholestérol ou 3,33 cm^3 de bichromate N/10. Notre équation indique 3,32.

Tableau I

OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU CHOLESTEROL

par 1 cm³ de mélange Sulfochromique $\frac{N}{2}$ (50 p. 100 SO^4H^2)

1 cm³ SO^4H^2 concentré

15 minutes au B. M. bouillant (Titre de ferrocyanure 37,8)

Cholestérol mis en œuvre mg.	Ferrocyanure $\frac{N}{80}$ cm3	Bichromate $\frac{N}{2}$ Restant cm3	Bichromate $\frac{N}{2}$ Consommé cm3	Cholestérol calculé mg.	Erreur absolue gamma	Erreur relative p. 100
0,10	34,4	0,922	0,077	0,115	+ 15	+ 15
0,15	33,1	0,874	0,126	0,185	+ 35	+ 23
0,25	31,2	0,824	0,176	0,260	+ 10	+ 3,8
0,35	28,3	0,750	0,250	0,370	+ 20	+ 5,4
0,50	25,0	0,661	0,339	0,501	+ 1	+ 0,2
0,75	19,9	0,505	0,495	0,732	— 18	— 2,4
0,90	15,5	0,410	0,590	0,873	— 27	— 3
1.00	13,0	0,342	0,658	0,973	— 27	— 2,7
1,25	78,0	0,206	0,794	1,175	— 75	— 6,3

N. B. — La prise de 1 mg. 25 de cholestérol a été oxydée par 2 cm³ mélange sulfochromique et 2 cm³ de SO^4H^2.

Les dosages sur des petites quantités sont entachés d'une erreur par excès de 10 à 30 γ.

Il faut tenir compte de la difficulté de mesurer avec précision des prises de cet ordre. Entre 0,5 et 1,25 mg. l'erreur absolue est par défaut du même ordre de grandeur et marque la diminution de l'excès d'oxydant en fin de dosage. C'est là un inconvénient connu de ces oxydations par une quantité limitée de bichromate auquel on ne prête en général pas assez d'attention dans l'appréciation des résultats. En effet, pour 0,10 mg. de choles-

térol, on met en œuvre plus de dix fois la quantité de bichromate nécessaire.

Pour 1,25 mg. le rapport $\frac{\text{bichromate offert}}{\text{bichromate consommé}}$ n'est plus 10, mais 1/0,8, soit 1,25.

Malgré cette imperfection, le résultat d'ensemble est excellent et les erreurs relatives restent acceptables.

Nous verrons par la suite que l'oxydation du cholestérol dans le complexe est plus régulière encore, comme si la dilution du stérol par le digitonoside en rendait l'attaque plus facile. Peut être la forme physique du complexe (aspect microcristallin en oursins présentant un aspect feutré s'il est en quantité notable) est elle plus favorable à une oxydation régulière.

§ II. — OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU DIGITONOSIDE

Cette étude a pu être réalisée de façon toute semblable à celle utilisée pour le cholestérol.

La difficulté était de préparer une solution suffisamment stable titrant exactement 1 p. 1.000. Après quelques essais infructueux avec l'eau, l'alcool, le solvant E. A. C. de Caminade, nous avons finalement fait nos étalonnages sur une solution de digitonoside à 1 p. 1.000 dans le solvant de Paget-Pierrart, le moins instable de ceux que nous connaissions. En effet, les solutions ne déposent qu'après quatre jours.

Digitonoside	0,1 cm³
Méthanol	50 cm³
Ethanol	33,4 cm³
Trichloréthylène	16,6 cm³

La dissolution s'effectue parfaitement bien après un séjour de quelques heures à l'étuve à 45°.

On mesure dans des tubes parfaitement propres des quantités variables de cette solution. Le solvant est évaporé totalement et l'oxydation réalisée pour 1 cm^3 de réactif sulfochromique (N/2 50 p. 100 de SO^4H^2) et 1 cm^3 de SO^4H^2 pur au bain-marie bouillant pendant quinze minutes.

Pour des raisons que nous n'avons pu élucider l'acide employé, malgré le traitement au perhydrol, présentait de façon persistante une certain autoréduction dans les conditions de l'expérience. Nous avons dû en tenir compte dans nos calculs.

Le titre N du ferrocyanure pour 1 cm^3 de bichromate N/2 à froid en présence de 1 cm^3 SO^4H^2 était N = 37,8.

Le titre N' du mélange sulfochromique chauffé quinze minutes au bain-marie bouillant était N' = 36,6.

Tout se passe comme si on mettait en œuvre

$$\frac{36,6}{37,8} = 0,971 \text{ cm}^3 \text{ de bichromate N/2.}$$

Le tableau II rend compte des résultats obtenus. Le coefficient moyen de réduction est

$$\frac{4,776}{12,66} = 0,376 \text{ cm}^3$$

de bichromate N/2 pour 1 mg. de digitonoside ce qui permet d'établir l'équation d'oxydation suivante :

$$C^{55}H^{94}O^{28} + 141\,O = 47\,CO^2 + 39\,H^2O + 4\,CH^3CO^2H.$$

Tableau II

OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU DIGITONOSIDE

par 1 cm³ de mélange Sulfochromique $\frac{N}{2}$ (50 p. 100 SO^4H^2)
et 1 cm³ SO^4H^2 concentré
15 minutes au bain marie bouillant
Titre de Ferrocyanure 37,8

Digitonine mise en œuvre mg.	Ferrocyanure $\frac{N}{80}$ cm3	Bichromate		Digitonine calculée mg.	Erreur	
		Restant cm3	Consommé cm3		absolue gamma	relative p. 100
0,16	34,7	0,917	0,054	0,143	—17	—10
0,25	33,2	0,878	0,093	0,246	—4	—1,6
0,35	31,7	0,838	0,139	0,353	+3	—1,1
0,50	29,0	0,767	0,204	0,540	+40	+1,2
0,75	26,4	0,673	0,298	0,790	+40	+5,3
0,90	22,9	0,605	0,366	0,970	+70	+7,7
1,00	21,6	0,590	0,392	1,040	+40	+4
1,25	19,3	0,510	0,460	1,220	+30	+2.4
1,50	15,8	0,419	0,552	1,460	—40	—2,6
1,75	12,9	0,342	0,629	1,670	—80	—4,6
2,00	8,75	0,231	0,740	1,96	—30	—1,5
2,25	4,8	0,126	0,845	2,240	—10	—0,4

La formule développée du digitonoside est trop incertaine pour qu'on puisse lui appliquer les règles de CORDEBARD et vérifier le bien-fondé de cette équation. La régularité des chiffres obtenus, avec les mêmes réserves que pour le cholestérol, montre que nos conditions d'oxydation sont correctes et qu'on peut retrouver pour le complexe cholestérol digitonoside des résultats aussi satisfaisants.

§ III. — OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU COMPLEXE CHOLESTEROL DIGITONOSIDE

Cette oxydation était la pierre de touche de la technique que nous nous proposions de réaliser. Il importait d'assurer le coefficient d'oxydation avec le maximum de sécurité.

Pour cela, il nous fallait préparer le complexe aussi pur que possible et faire une solution stable. Employant toujours la même technique, nous allons là encore mesurer des quantités variables de notre solution étalon. Cette manière de faire nous semble plus commode et plus précise que la technique des étalonnages par pesées. D'autres auteurs ayant étudié la chromométrie du complexe et en particulier Kayser et Mathieu pesèrent une quantité déterminée de complexe.

Préparation du complexe

On précipite 25 mg. de cholestérol par une quantité de digitonoside légèrement supérieure à la quantité théorique (cette précaution étant indispensable à une précipitation totale), soit 75 mg. Nous avons employé la technique de Paget-Pierrart (milieu trichloréthylène méthanol ethanol).

Au lieu d'opérer au bain-marie, nous avons effectué la précipitation à l'étuve à 100°. Après addition d'acétone hydratée, nous avons attendu la précipitation. Le complexe est lavé trois fois abondamment à l'éther pour le débarrasser du cholestérol en excès. Un nombre équivalent de lavages à l'eau chaude devait le débarrasser de la digitonine en excès.

Purification

Nous avons estimé qu'il serait intéressant de purifier le complexe par recristallisation.

Nous avons recherché un bon solvant du complexe et avons finalement adopté la formule suivante :

Chloroforme } aa
Méthanol }

La dissolution se fait à chaud. Après filtration, la solution a été mise dans une capsule à fond plat de 7 à 8 cm. de diamètre, disposée dans une étuve à 45°. Après 12 heures, le solvant chassé, il restait au fond de la capsule de très beaux cristaux blancs en oursins d'un diamètre de 1 à 2 mm.

Les cristaux ainsi formés sont détachés avec précautions à l'aide d'une spatule en évitant de gratter le fond de la capsule ce qui entraînerait des parcelles non cristallisées.

Les cristaux sont mis pendant quelques heures dans un exsicateur. La pesée ne présente aucune difficulté le complexe n'étant pas hygroscopique. La dissolution se fait à chaud dans le solvant chloroformeméthanol à parties égales. Nous avons évité l'ébullition de crainte de modifier la composition du milieu par départ des solvants et de réduire le pouvoir dissolvant. Dans ce but nous avons disposé sur l'Erlenmeyer un entonnoir faisant office de réfrigérant.

La solution est parfaitement stable pendant plus d'une semaine et permet des étalonnages avec une solution de titre constant.

Le tableau III rend compte des résultats obtenus.

En associant par le calcul les chiffres traduisant le pouvoir réducteur du cholestérol et ceux du digitonoside nous devons trouver le coefficient du complexe.

D'après les étalonnages précédents nous voyons que :

Tableau III

OXYDATION SULFOCHROMIQUE DU COMPLEXE

Titre Ferrocy : 37,6 en présence de 1 ou 2 cm³ de Sulfochr. $\frac{N}{2}$ 15' B. M

Titre Sulfochr. : 0,964 + 2 cm³ SO^4H^2 concentré

Quantité de complexe mis en œuvre mg.	Ferrocyanure $\frac{N}{80}$ cm3	Bichromate			Complexe calculé mg.	Erreur	
		Mis en jeu cm3	Restant cm3	Consommé cm3		absolue gamma	p. 100
0,25	32,5	1	0,864	0,100	0,241	—9	—3,6
0,50	28,0	1	0,763	0,201	0,484	—16	—3,2
0,75	24,5	1	0,651	0,313	0,754	+4	+5,3
1,00	20,2	1	0,537	0,427	1,029	+29	+2,9
1,25	16,5	1	0,438	0,526	1,267	+17	+1,3
1,50	13,0	1	0,345	0,619	1,491	—9	—0,6
1,75	8,9	1	0,236	0,728	1,754	+4	—2,2
2,00	4,4	1	0,117	0,847	2,041	+41	—2,2
2,25	36,7	2	0,976	0,952	2,290	+40	+1,6
2,50	33,55	2	0,892	1,036	2,500	0	0
2,75	29,35	2	0,777	1,141	2,750	0	0
3,00	26,0	2	0,691	1,237	2,981	—19	—0,6
3,25	21,20	2	0,563	1,365	3,290	+40	+1,2
3,50	17,50	2	0,465	1,463	3,525	+25	+0,7
3,75	13,70	2	0,364	1,564	3,770	+20	+0,5
4,00	10,40	2	0,273	1,655	3,988	—12	—0,3
4,25	7,05	2	0,187	1,741	4,195	—55	—1
4,50	3,30	2	0,087	1,841	4,430	—70	—1,5

a) 1 molécule-gramme de cholestérol réduit

$0,66 \times 386 = 257$ litres de mélange sulfochromique $\frac{N}{2}$

b) 1 molécule-gramme de digitonoside réduit

$0{,}376 \times 1.202 = 451$ litres de mélange sulfochromique $\frac{N}{2}$

c) 1 molécule-gramme de complexe réduirait

$257 \times 451 = 708$ litres de mélange sulfochromique $\frac{N}{2}$

ce qui correpond à un coefficient d'oxydation de 2,41.

Pratiquement la quantité de mélange sulfochromique réduite par le complexe est inférieure à la somme des quantités partiellement réduites par chacun des deux éléments qui le constituent.

Nous concluons que les propriétés réductrices du cholestérol et du digitonoside ne sont pas additives dans le complexe. Nous supposons qu'il y a formation d'une nouvelle molécule d'acide acétique qui abaisse le pouvoir réducteur.

La courbe obtenue étant une droite et les chiffres très satisfaisants nous établissons le coefficient d'oxydation d'après cette courbe, soit 2,41.

CHAPITRE IV

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION COMPLEXE CHOLESTÉROL DIGITONOSIDE

Résumons très succinctement les différentes techniques de précipitations et les remarques des auteurs dont nous nous sommes inspirées et nos constatations personnelles.

Technique de Windaus :

Macrodosage pour des quantités de cholestérol supérieures à 10 mg.

La précipitation est faite en milieu alcoolique à l'ébullition dans un petit bécher. Elle a lieu lorsque le titre est abaissé au-dessous de 95°. On emploie une solution de digitonine à 1 % dans l'alcool absolu.

Les lavages sont faits avec de l'alcool à 90° et de l'éther absolu.

Inconvénients. — La solution alcoolique de digitonine est éminemment instable.

La précipitation n'est totale qu'après plusieurs heures.

La méthode n'est pas fidèle et donne des écarts notables.

Elle est inutilisable pour des quantités inférieures à 5 mg.

Technique de Caminade :

Macrodosage pour des quantités voisines de 10 mg.

La précipitation est faite à l'ébullition au sein d'un milieu alcool-acétone-eau.

Solution de digitonine à 0,5 % dans un mélange E. A. C.

Acétone 73 parties.
Eau 18 parties.
Alcool 9 parties

La précipitation est plus rapide que celle obtenue dans la méthode de Windaus.

Elle est achevée après quelques minutes.

Les lavages sont faits avec le mélange E. A. C.

Caminade constate qu'un gros excès de digitonine donne des erreurs par excès.

Un petit excès de digitonine donne des erreurs par défaut mais beaucoup moins fortes que dans le cas précédent.

L'auteur affirme que de petites quantités de cholestérol ne peuvent être dosées avec précision de cette façon et qu'il faut opérer sur des quantités d'au moins 6 mg. si l'on veut avoir une assez bonne approximation.

Inconvénients. — Le solvant E. A. C. dissout difficilement le digitonoside. La solution est en outre très instable puisqu'elle précipite spontanément dans les 24 heures qui suivent sa préparation.

L'instabilité de cette formule a été constatée par Paget et Pierrart et amena ces deux auteurs à chercher une formule nouvelle. Nous mêmes avons fait la même constatation. D'autre part la dissolution de digitonoside d'après Caminade n'était pas totale. Peut être l'échantillon de digitonine dont nous disposions à ce moment était-il responsable de cette dissolution pénible. En effet nous avons pu remarquer pour un même solvant

des petites variations de la solubilité d'un échantillon à l'autre.

Technique de Girardin et Spach :

Microdosage pour des quantités variant entre 0,50 et 2 mg. de cholestérol.

C'est la méthode de CAMINADE modifiée. La précipitation est faite à l'ébullition. Les auteurs emploient une solution de digitonine à 2 % dans l'alcool à 80° qu'ils stabilisent en éliminant par filtration les portions de glucoside qui ont précipité après plusieurs heures ou plusieurs jours. Le titre est ramené par concentration à 2 p. 100.

Inconvénients. — La purification du complexe est assez fastidieuse puisqu'il faut un total de 12 lavages (Eau bouillante, Alcool, Acétone, Ether).

Technique de Paget et Pierrart :

Cette technique de précipitation préconisée par les auteurs n'est pas une méthode de dosage pondéral à proprement parler. Ce n'est en réalité qu'une opération auxiliaire permettant d'éliminer le cholestérol libre entre deux dosages colorimétriques dont le premier donne le chiffre de cholestérol total et le deuxième le chiffre de cholestérol estérifié.

Le complexe est éliminé par filtration et n'est pas destiné à être évalué par pesée.

Les auteurs proposent un solvant nouveau dont la formule est :

Digitonoside 0,50
Méthanol 50 cm³
Trichloréthylène 1 volume } q. s. p. 100 cc.
Ethanol 2 volumes }

L'oside doit se dissoudre très rapidement à froid par simple agitation. Pour dissoudre la digitonine dans

ce milieu nous avons néanmoins été obligé d'avoir recours à un séjour de quelques heures à 45°. Le méthanol stabilise la solution. Par ailleurs il est responsable de la dissolution partielle du complexe. C'est pour cette raison qu'au cours de la précipitation qui se fait à l'ébullition il est indispensable de concentrer le solvant pour évaporer le méthanol.

Les auteurs constatent que l'addition de quantités croissantes d'acétone hydratée fait regresser le taux de cholestérol non précipité.

Ils conseillent de diminuer l'excès de digitonine. Ils constatent que le facteur théorique 0,2431 par lequel on multiplie le poids de complexe pour avoir le poids de cholestérol n'est pas parfait. La réaction de combinaison molécule à molécule n'est pas quantitative d'après Paget et Pierrart. Les auteurs imputent les différences aux impuretés de l'oside qui, selon Windaus, aurait comme formule :

70-80 % digitonine pure.
10-20 % gitonine.
5-15 % autres saponines.

Inconvénients. — Ce n'est pas une méthode dans laquelle le complexe est évalué directement.

NECESSITE DE TROUVER UNE NOUVELLE METHODE DE PRECIPITATION

Dans toutes les méthodes proposées jusqu'à ce jour le complexe est précipité à chaud dans une capsule ou un bécher de dimensions convenables chauffé à feu nu ou au bain-marie. Le précipité formé est recueilli sur un filtre en papier pour le dosage gravimétrique, sur un creuset ou sur filtre de Pregl sur lequel il est lavé et séché lorsqu'il est destiné à un dosage chromométrique.

Toutes ces techniques sans exception utilisent la

filtration, par conséquent nécessitent un transvasement des liquides et du complexe. Or ce précipité est peu maniable, puisqu'il se colle avec une très grande facilité sur les parois du récipient. Pour obvier à cet inconvénient CAMINADE recommande l'emploi d'un agitateur gaîné de caoutchouc à son extrémité. Si d'une façon générale il est assez délicat de transvaser quantitativement le complexe, les difficultés s'accroissent si l'on ne dispose que de 1 ou 2 mg. de micro précipité comme cela doit être le cas dans notre méthode.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'éviter simplement tout transvasement en gardant dans un même récipient le complexe dès sa naissance jusqu'à la fin du dosage c.a.d. jusqu'au terme final de l'oxydation chromique.

A cet effet nous employons un tube cylindro-conique de centrifugeuse d'une capacité de 20 à 25 cc. environ, haut de 80 mm. et d'un diamètre intérieur maximum de 25 à 30 mm. Nous mettons en présence dans ce tube la solution de cholestérol et le réactif précipitant. La précipitation achevée, la séparation du complexe, le lavage et l'évaporation du solvant seront faits dans ce même tube qui est prêt à recevoir finalement le mélange chromique. L'oxydation se faisant à chaud il est aisé de plonger le tube dans l'eau d'un bain-marie bouillant et de le maintenir à un niveau convenable par un dispositif quelconque.

PRECIPITATION A FROID DU COMPLEXE

Opérant dans un tube de centrifugeuse nous ne pouvions faire de précipitation à chaud par manque de volume. L'ébullition des solvants volatils qui constituent le milieu de précipitation étant toujours assez tumultueuse.

Bien qu'à notre connaissance aucun auteur n'ait jamais proposé la précipitation à froid nous avons fait des essais dans ce sens ayant entrevu dans cette manière d'opérer la possibilité d'éliminer un inconvénient ayant gêné nos précurseurs : la dissolution du complexe à chaud.

Avantages d'une précipitation à froid.

1° Les pertes par solubilité sont réduites au minimum. Tous les milieux proposés dissolvent à chaud une certaine quantité de complexe. C'est pour cette raison que les auteurs recommandent d'attendre le refroidissement complet du milieu pour assurer une précipitation totale du complexe dissout à chaud. Le risque de perte par dissolution est augmenté à l'échelle micro-analytique. Nous avons retrouvé dans le filtrat après un repos de plusieurs heures, du complexe que nous avons dosé. Grâce au dosage de la quantité de complexe ainsi échappé nous devions très sensiblement retrouver le chiffre théorique de cholestérol connu que nous nous étions proposé de doser par la méthode de Paget et Pierrart.

2° La précipitation à froid une fois commencée ne demande aucune surveillance particulière telle que la concentration par ébullition à un volume déterminé, l'addition de digitonine à un moment précis, etc.

3° Les dosages en série deviennent possibles et l'on peut mener de front deux dosages faits sur un même échantillon de sérum ou de plasma.

4° On évite un changement de composition du milieu par départ des solvants volatils.

TECHNIQUE DE LA PRECIPITATION A FROID

Amorçage

Conditions à remplir

Une technique pour être intéressante doit permettre une précipitation totale et aussi rapide que possible du

cholestérol. De plus la solution de digitonine employée doit être stable. Nous avons d'abord essayé d'obtenir la formation du complexe par simple mélange des solutions alcooliques de cholestérol et de digitonine. Les débuts de la précipitation dans ces conditions n'apparaissent qu'après 2 heures pour 1 mg. de cholestérol mis en présence de 4 mg. de digitonine. Nous avons employé des solutions à 1 pour 1.000, et avons constaté que la précipitation était d'autant plus longue à se faire que la concentration du milieu en cholestérol était plus faible.

L'amorçage par frottement dans les mêmes conditions de concentration en cholestérol et en digitonine donne une précipitation après quelques minutes. Nous avons donc retenu et adopté cette façon d'amorcer la précipitation.

Voici comment nous opérons :

On tient le tube verticalement d'une main et l'on frotte avec l'autre la paroi à l'aide d'un micro agitateur. Le frottement se fait de haut en bas au sein du liquide, suivant une génératrice du tube. On laisse l'agitateur dans le tube pour ne le retirer qu'à l'instant où l'on veut centrifuger pour permettre d'agiter de temps en temps. La solution d'abord parfaitement limpide se trouble très légèrement après quelques secondes d'amorçage. Ce trouble uniforme s'intensifie. Le contenu du tube devient d'un blanc laiteux. A partir de ce moment il est inutile de poursuivre l'amorçage. Bientôt le complexe flocule et peu à peu se sédimente partiellement tandis que le contenu du tube s'éclaircit et redevient limpide.

Caminade utilisa le premier de l'acétone comme solvant du digitonoside. Paget et Pierrart démontrent que le taux de cholestérol non précipité régressait pour des quantités croissantes d'acétone. Mais l'acétone doit être hydratée. Dans le solvant de Caminade nous trouvons 18 % d'H^2O. Paget et Pierrart emploient 6 cc. d'acétone très faiblement hydratée (moins de 5 p. 100). Nous

avons mis à profit les constatations de ces auteurs. Comme l'acétone est un mauvais solvant du complexe nous l'avons utilisé pour favoriser la précipitation. Nous avons constaté que fortement hydraté il hâtait la précipitation dans le cas de faibles quantités de cholestérol. Nous employons 4 cc. d'acétone hydraté au quart.

VITESSE DE PRECIPITATION

Nous avons étudié l'amorçage et la vitesse de précipitation avec 1 mg. de cholestérol en solution alcoolique à 1 p. 1.000 (alcool à 95°) précipité avec 4 cc. d'une solution de digitonine à 2 p. 1.000 de la composition suivante :

Digitonine 0 g. 20.
Alcool à 95° 80 cc.
Chloroforme 20 cc.

La précipitation a été faite en présence de 3 cc. d'acétone hydratée à 10 %.

Bien que dans la suite nous ayons modifié le titre de la solution de digitonine destinée à des dosages pratiques pour des quantités de cholestérol allant de 0 mg. 25 à 2 mg. dans des conditions standard, les conditions de la précipitation et la vitesse sont restées sensiblement identiques.

Quantité de Cholestérol mis en œuvre en mg.	Durée de l'amorçage en min.	Durée du repos	% de cholestérol précipité
1	10''	Trouble	
1	45''	Floculation commençante	
1	1'	0	87
1	2'	0	88
1	2'	5	92
1	2'	10'	98
1	2'	20'	100

Nous voyons donc d'après ce tableau que 87 p. 100 du cholestérol sont précipités au cours de l'amorçage déjà. Les 13 p. 100 qui restent ne sont complètement précipités qu'après 20 minutes.

L'amorçage est d'autant plus utile que la quantité de cholestérol en présence est faible ou que pour une quantité constante de cholestérol et de digitonine le milieu est plus dilué.

CONDITIONS NECESSAIRES A UNE PRÉCIPITATION COMPLETE A FROID

1° *EXCES DE DIGITONINE*

Dans toutes les méthodes de précipitation à chaud il faut un certain excès de digitonine. Cet excès est variable suivant les techniques et les opinions des auteurs sont assez divergentes.

Caminade avait constaté que si l'on ajoutait une solution de plus en plus concentrée de digitonine dans son solvant alcool, eau, acétone tout en conservant dans le milieu final toujours la même proportion relative de digitonine et de cholestérol, ou avait des erreurs en plus.

Ce même auteur affirme qu'un grand excès de digitonine donne des erreurs en plus, plus fortes que les erreurs par défaut obtenues avec un petit excès.

Il adopte donc la précipitation avec un faible excès de digitonine qui représente cependant sensiblement trois fois la quantité qu'il faudrait théoriquement.

Fontès estime par contre qu'un gros excès de digitonine n'est pas gênant.

Nous avons pu constater que :

Si dans une précipitation à chaud on obtient toujours la condensation des deux éléments du complexe avec un petit excès du réactif, il n'en est pas de même

pour une précipitation à froid. Il nous faut au moins 7 fois la quantité théoriquement nécessaire de cet oside. La floculation que nous avons considérée comme premier test en faveur d'une précipitation déjà très avancée (*cf* tableau sur la vitesse de précipitation) apparaît d'autant plus vite que pour un volume constant le milieu est plus riche en digitonoside et en cholestérol.

Si nous voulons que la précipitation se fasse dans un laps de temps acceptable pour un dosage pratique, c'est-à-dire en moins d'une demi-heure, ce gros excès est indispensable. Nous avons constaté comme CAMINADE que les dosages de petites quantités de cholestérol en présence d'un gros excès de digitonine étaient entachés d'une grosse erreur en plus avant le lavage, cette surcharge disparaît complètement avec un seul lavage. Malgré une surcharge extrêmement forte, nous éliminons facilement la digitonine puisque cette adsorption à température ordinaire est, supposons-nous, moins tenace.

Les auteurs qui nous ont précédé ont faits des lavages nombreux (jusqu'à 12 dans la méthode de GIRARDIN et SPACH) avec des solvants divers et peu courants (éther anhydre, alcool absolu). Nous proposons une solution de lavages saturée de complexe dont la formule est identique à celle du milieu de précipitation. Elle dissout en une seule fois la totalité de la digitonine fixée par le complexe le plus chargé sans rien enlever pratiquement du complexe lui-même lorsqu'il est peu chargé.

LAVAGES DU COMPLEXE

Comme nous venons de le voir, ces lavages jouent un rôle primordial. L'excès de digitonine plus que les impuretés extraites du sérum (insaponifiable, acides gras, etc.) est responsable de la surcharge à l'échelle à laquelle nous opérons. Cette surcharge se traduit par des

erreurs en excès représentant jusqu'à 40 p. 100 du chiffre théorique dans les conditions standard de nos dosages. (Voir page 75, tableau V, série II, dosage de 0,25 mg.)

Ayant établi des conditions de précipitation standard de façon à ce que dans un même volume de réactif nous puissions précipiter aussi bien 0 mg. 25 que 2 mg. de cholestérol et toutes les quantités intermédiaires en moins d'une demi-heure, nous avons eu le désir de nous trouver malgré des variations imprévisibles notables de cholestérol, toujours dans des conditions de précipitation optima.

Pour précipiter 2 mg. de cholestérol, nous sommes en présence de 7 fois plus de digitonine qu'il ne faut théoriquement.

Or dans ce même milieu, la plus petite quantité de cholestérol que nous précipitons pratiquement avec une bonne approximation, soit 0 mg. 25 se trouve donc en présence de 40 fois la quantité théorique de digitonine. Nous avons pour 0 mg. 25 de cholestérol, et ceci était à prévoir, une surcharge en digitonine maxima.

Cette surcharge va en décroissant vers les grandes quantités de cholestérol précipité.

Le temps de contact influe également. Lorsque le complexe, une fois la précipitation achevée, reste trop longtemps en suspension dans le milieu avant centrifugation, il se charge davantage par adsorption de digitonine.

Deux dosages de 1 mg. de cholestérol faits dans des conditions identiques (sans lavages) donnent une réduction correspondant à :

1 mg. 03 de cholestérol lorsque la centrifugation est faite dans la première heure ;

1 mg. 20 de cholestérol lorsque la centrifugation est faite après un contact de douze heures.

COMPOSITION DU MILIEU PRECIPITANT

Nous avons été amené à chercher un nouveau solvant du digitonoside puisque ni les formules de WINDAUS, CAMINADE ou de PAGET-PIERRART ne nous donnent entière satisfaction soit en raison de leur mauvaise conservation soit qu'elles fussent inaptes à une précipitation à froid.

WINDAUS emploie l'alcool absolu et la solution qu'il propose précipite dans les vingt-quatre heures. La formule de CAMINADE n'est guère plus stable. Celle de PAGET et PIERRART, dont nous avons pu faire un échantillon, est stable, mais deux raisons nous empêchèrent de l'adopter. Le manque de trichloréthylène, d'une part, et la présence de l'alcool méthylique, qui favorise la solubilité du digitonoside, mais qui gêne la précipitation du complexe. PAGET et PIERRART, avant la précipitation, recommandent de chasser cet élément gènant par évaporation. Précipitant le complexe à froid nous aurions dû avant usage débarasser la solution de digitonoside par une ébullition préalable de l'alcool méthylique. C'est une complication que nous avons voulu éviter.

Nous utilisons un mélange d'alcool à 95° et de chloroforme. L'addition de chloroforme favorise la conservation, mais nous avons dû nous borner à 20 p. 100 de chloroforme seulement puisque, si le solvant a une densité trop forte, la centrifugation du complexe se fait mal. La tension superficielle intervient également puisque, après centrifugation, des parcelles de complexe surnagent dans un milieu trop riche en chloroforme.

Nous utilisons pour nos précipitations à froid deux

solutions distinctes et conservées séparément. La solution de digitonine est gardée à l'abri de la lumière.

1° Une solution à 4 p. 1.000 de digitonine.

Digitonine	0,4 g.
Alcool à 95°	80 cm³
Chloroforme	20 cm³
Acétate d'ammoniaque	0,05 g.

2° Un mélange acétone-eau :

Acétone	75 cm³
Eau distillée	25 cm³

Rôle de l'acétate d'amoniaque comme agent de stabilité.

Nous avons constaté, au cours de nos recherches en vue de trouver un solvant stable de la digitonine qu'on peut redissoudre l'oside d'une solution précipitée en y ajoutant quelques gouttes d'acide acétique et d'ammoniaque. Par une forte agitation dans ces conditions les flocons de digitonine se redissolvent et la digitonine reste en solution.

Nous avons pensé qu'en ajoutant, dès le début, de l'acétate d'amoniaque en petite quantité nous pourrons éviter ou du moins retarder la précipitation.

C'est en effet ce que nous avons constaté. Une solution conservée dans ces conditions, à l'abri de la lumière, était encore stable après 27 jours. Son pouvoir précipitant du cholestérol n'a nullement été diminué et nous avons pu farie des précipitations dans les mêmes conditions et des dosages aussi précis qu'avant l'addition d'acétate d'ammoniaque.

L'addition de ce sel ne gène nullement la chromométrie puisqu'il se trouve dans la solution à l'état de traces si minimes qu'il ne saurait intervenir. Il est volatil puisque quelques cristaux sur un verre de montre placé

dans une étuve à 100° disparaissent sans laisser de résidus. Même fixé sur le complexe il disparaitrait avec les solvants puisque nous soumettons les tubes renfermant le complexe centrifugé et lavé pendant 10 minutes à la température de 100°.

Nous aurions voulu connaître plus exactement le rôle réel de l'acétate d'ammoniaque comme agent de conservation des solutions de digitonine et ne pas nous contenter d'une constatation purement empirique. Une étude approfondie de ce phénomène aurait nécessité une certaine quantité de digitonine. Ne disposant que d'une quantité limitée de ce produit, il ne nous a pas été possible d'en distraire pour des recherches d'ordre secondaire de ce genre.

Préparation de la solution de digitonine

L'oside pesé est mis dans un Erlemeyer. On verse sur la digitonine de l'alcool chaud. Par agitation, la plus grande partie se dissout instantanément. On achève la dissolution par un séjour de 5 à 10 minutes à 100° dans une étuve électrique, par exemple.

On ajoute à la solution l'acétate d'amoniaque après refroidissement. On verse dans une éprouvette. On ajoute la quantité prescrite de chloroforme que l'on dissout. On complète au besoin avec de l'alcool. Agiter et filtrer dans un flacon à bouchon rôdé. Conserver à l'abri de la lumière.

Si après un mois la solution devait présenter un léger trouble, il suffirait de la mettre quelques heures dans une étuve à 37 ou à 45°. En agitant, la température aidant, la solution redevient parfaitement limpide et sa stabilité est à nouveau assurée pour une durée de même ordre.

MODE OPERATOIRE POUR PRECIPITER DES QUANTITÉS DE CHOLESTEROL ALLANT DE 0,25 à 2 mg.

Précipitation.

Dans un portoir on dispose le ou les tubes cylindro-coniques de dimension convenable dans lesquels on fera la précipitation. Chaque tube est pourvu d'un micro-agitateur qui lui est affecté pendant toute la durée du dosage.

On introduit la solution alcoolique renfermant le cholestérol à doser. Volume maximum 2 cm^3.

Ajouter : 10 cc. de la solution de digitonine,
4 cc. acétone hydratée.

Amorcer par frottement jusqu'à apparition d'un louche notable. Laisser reposer. On peut avec l'agitateur remuer une ou deux fois le mélange pendant la durée de la précipitation.

Séparation du Complexe.

La précipitation achevée, on retire le micro-agitateur qu'on laisse égoutter soigneusement. On centrifuge dix minutes à vitesse maxima (3.000 à 4.000 tours à la minute).

Après la centrifugation on décante le liquide surnageant avec une pissette d'Ambard. On recueille toutes ces solutions en vue d'une récupération de la digitonine. Nous donnerons plus loin la technique employée.

Lavages du Complexe.

La solution destinée aux lavages a une composition semblable à celle du milieu précipitant. Elle est cepen-

dant moins riche en acétone, qui dissout difficilement la digitonine.

La composition que nous préconisons est :

Alcool	77 cc.
Acétone	3 cc.
Chloroforme	20 cc.
Complexe	q. s. pour saturer.

Nous recommandons l'emploi d'un ballon pissette de 50 ou 100 cc. pour les lavages.

On dirige un jet de pissette contre la paroi du tube auquel on imprime un mouvement de rotation pour entraîner les impuretés sur tout le pourtour. Mettre le précipité en suspension à l'aide d'un agitateur dans 2 à 3 cc. de solution. Veiller à ce que le culot de centrifugation soit bien désagrégé. Retirer l'agitateur après l'avoir lavé d'un jet de pissette.

Centrifuger 5 minutes à vitesse maxima, décanter.

Evaporation des résidus de solvant après décantation.

Nous mettons les tubes dans une étuve à 100° pendant 10 minutes ou au bain-marie bouillant. S'assurer avant de les retirer que les culots sont bien secs et ne dégagent plus d'odeur d'alcool ou de chloroforme.

Ainsi préparés les tubes sont prêts à recevoir le mélange sulfochromique en vue du dosage chromométrique du complexe purifié.

PREPARATION DU COMPLEXE DESTINE A LA SATURATION DU SOLVANT DE LAVAGE

On précipite à chaud dans une capsule une certaine quantité de cholestérol dans l'alcool à 95° par la quantité correspondante de digitonine dans le même solvant. Après quelques heures de repos, on centrifuge le résultat

de cette opération. On décante l'alcool. Le complexe est lavé par mise en suspension dans de l'alcool pour enlever l'excès de digitonine. Centrifuger et répéter l'opération avec de l'éther pour éliminer le cholestérol non combiné. On sèche le complexe qui doit avoir l'aspect de paillettes blanches nacrées. Ainsi débarassé de l'excès non combiné de l'un ou de l'autre des constituants, le complexe purifié sera mis en contact du solvant de lavage dont nous avons donné la formule ci-dessus.

RECUPERATION DE LA DIGITONINE

Cette opération nous semble justifiée pour différentes raisons, qui sont : la rareté du produit, son prix relativement élevé et l'emploi dans notre méthode d'un grand excès non combiné de cette saponine. La récupération nous paraît donc intéressante et nous l'avons pratiquée avec succès.

Les solutions décantées après centrifugation sont filtrées et mises dans une fiole à vide munie d'un bouchon traversé par un tube effilé plongeant presque jusqu'au fond de la fiole. On branche l'appareil sur une trompe et on fait circuler un courant d'air qui barbote dans la solution qui se trouble. On concentre ainsi jusqu'au dixième du volume initial.

On fait une deuxième concentration dans une capsule à chaud jusqu'à moitié volume. Les solvants volatils sont, à ce stade de l'opération à peu près complètement évaporés. On met deux ou trois jours dans une cloche à vide jusqu'à siccité. On détache la digitonine que l'on lave par mise en suspension et centrifugation successivement dans l'acétone, dans l'alcool et finalement dans l'éther. On sèche le produit obtenu, qui doit être blanc et finement pulvérulent, à 45° ou à la température ordinaire.

Le rendement de cette opération est de 60 à 70 pour 100 environ.

La digitonine ainsi récupérée se prête à la préparation des solutions tout comme la digitonine provenant directement du laboratoire qui l'a fabriquée.

Elle est tout aussi stable et permet des dosages comme la digitonine fraîche.

DOSAGES DU CHOLESTEROL EN SOLUTION PURE

Précipitation avec un petit excès de Digitonine.

CONDITIONS VARIABLES

Complexe non lavé

Nous donnons ici des chiffres démontrant la légitimité de ce que nous venons d'énoncer au sujet de l'utilité de l'excès de digitonine pour une précipitation totale. Ces constatations découlent d'un très grand nombre de dosages. Nous ne donnerons que les trois séries les plus intéressantes qui nous ont amenées aux conditions standard que nous avons finalement adoptées.

Chaque série comporte 8 dosages de cholestérol en solution pure allant de 0,25 à 2 mg.

Il a été utilisé une solution de cholestérol à 1 p. 1.000 dans l'alcool à 95°.

Série I :

4 cm³ de solution de digitonine à 2 p. 1.000, soit 8 mg. de digitonine.—

3 cm³ acétone hydratée à 10 p. 100.

Volume total du milieu de précipitation variant avec le volume de la solution de cholestérol à 1 p. 1.000 utilisée, c'est-à-dire allant de 7,25 à 9 cm³.

Série II :

4 cm³ de solution de digitonine à 2 p. 1.000, soit 8 mg. de digitonine.

3 cm³ acétone hydratée à 10 p. 100.

Volume constant (après évaporation de la solution de cholestérol), soit 7 cm³.

Série III :

8 cm³ de solution de digitonine à 2 p. 1.000, soit 16 mg. de digitonine.

3 cm³ acétone hydratée à 10 p. 100.

Volume allant de 11,25 cm³ à 13 cm³.

Tableau V

INFLUENCE DE L'EXCES DE DIGITONINE SUR LA PRECIPITATION DU COMPLEXE

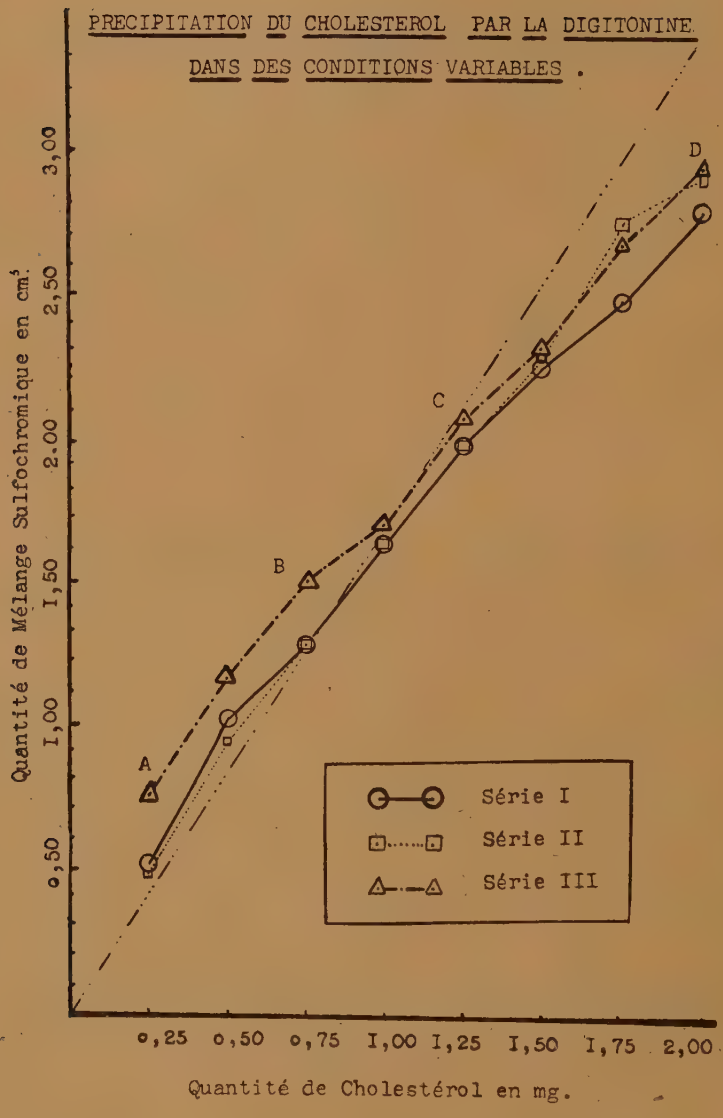
(sans lavages)

Cholestérol mis en œuvre mg.	SERIE I		SERIE II		SERIE III	
	Bichromate consommé cm3	Cholestérol trouvé mg.	Bichromate consommé cm3	Cholestérol trouvé mg.	Bichromate consommé cm3	Cholestérol trouvé mg.
0,25	0,551	0,32	0,760	0,45	0,522	0,31
0,50	1,055	0,52	1,160	0,69	0,978	0,58
0,75	1,307	0,77	1,526	0,91	1,305	0,77
1,00	1,661	0,95	1,729	1,03	1,661	0,95
1,25	2,011	1,20	2,069	1,23	2,003	1,19
1,50	2,279	1,33	2,354	1,40	2,335	1,39
1,75	2.509	1,49	2,710	1,61	2,794	1,66
2,00	2,830	1,68	2,991	1,78	2,952	1,76

CALCULS

Nous avons déterminé :

1° La quantité de complexe à partir de la quantité de bichromate consommé.



2° Le poids de cholestérol à partir de la quantité de complexe en multipliant par le facteur 0,2431.

Pour une première approximation, les chiffres ont été calculés de cette façon. Nous verrons plus loin le facteur qui nous permettra de passer directement de la quantité de sulfochromique au poids de cholestérol dosé.

Examinons les courbes qui traduisent ces chiffres. Considérons par exemple la courbe des chiffres donnés par la précipitation avec 8 cc. digitonine à 2 p. 1.000, toutes choses égales par ailleurs, et nous distinguons 3 segments.

Le segment AB. — Il correspond à une précipitation totale plus une forte surcharge de digitonine. Prolongé, il passerait très au-dessus de l'origine.

C'est la zône des chiffres trop forts.

Le segment BC. — Il correspond à une précipitation encore totale, la surcharge en digitonine tendant à décroître. Sur une certaine longueur, ce segment peut très approximativement être confondu avec la courbe théorique.

C'est la zône des écarts minima.

Le segment CD. — La courbe s'infléchit. La précipitation n'est plus totale.

C'est la zône des chiffres trop faibles.

Le phénomène est identique pour les autres courbes. En allant des petites quantités vers les grandes quantités de cholestérol précipitées, nous distinguons donc trois zones :

Une zône de précipitation totale avec forte surcharge ;

Une zône de précipitation totale avec faible surcharge ;

Une zône de précipitation incomplète.

Conclusions. — La zône de précipitation totale est d'autant plus large que l'excès de digitonine est grand.

La surcharge est proportionnelle à cet excès.

Modifications à apporter à la méthode.

Augmenter l'excès de digitonine.

Réduire la surcharge par lavage du complexe.

Précipitations avec un gros excès de Digitonine.

CONDITIONS STANDARD

LAVAGES

Mettant à profit les enseignements des dosages précédents nous avons déterminé les conditions permettant une précipitation totale de la plus forte quantité de cholestérol que nous nous proposions de doser par notre méthode, c'est-à-dire 2 mg. Nous avons été amené à modifier le titre de la solution de digitonine et avons adopté une solution à 4 p. 1.000. D'autre part, nous avons enrichi l'acétone en eau, l'hydratation hâtant la précipitation pour les faibles quantités de cholestérol.

Nous avons donc adopté la formule suivante :

10 cm³ sol. digitonine à 4 pour 1.000.

3 cm³ acétone.

1 cm³ eau.

Nous donnons 2 séries de 6 dosages,

— 1 série de dosage après lavages.

Série 1. — Conditions standard en volume croissant avec quantités de cholestérol ajoutées sous forme d'une solution alcoolique à 1 p. 1000 allant de 14,25 cm³ à 16 cm³.

Série 2. — Conditions standard en volume croissant, soit 16 cm³. Le volume a été maintenu constant par addition d'alcool à 95°.

Série 3. — Conditions standard suivies d'un lavage avec 2 à 3 cc. du mélange.

Alcool à 95° 77 cm³.

Chloroforme 20 cm³.

Acétone 3 cm³.

Complexe q. s. pour saturer.

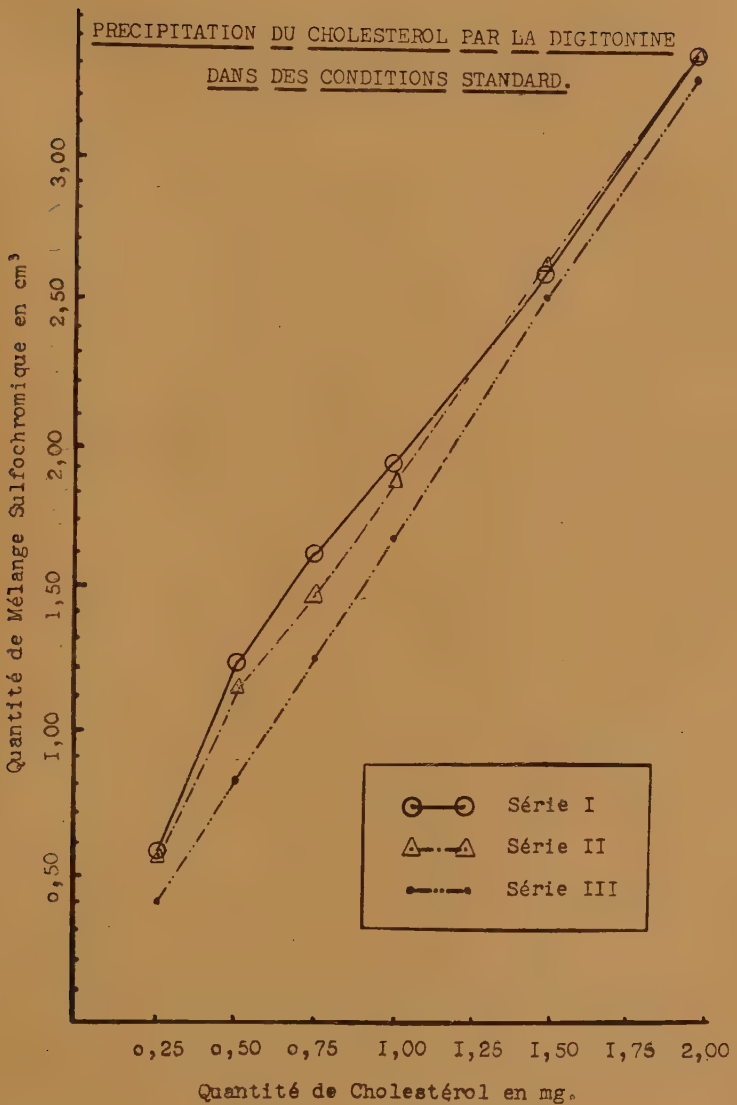

PRECIPITATION DU CHOLESTEROL PAR LA DIGITONINE
DANS DES CONDITIONS STANDARD.
Quantité de Mélange Sulfochromique en cm³
0,50
1,00
1,50
2,00
2,50
3,00
Série I
Série II
Série III
0,25
0,50
0,75
1,00
1,25
1,50
1,75
2,00
Quantité de Cholestérol en mg.

Tableau V

PRECIPITATION DU COMPLEXE DANS DES CONDITIONS STANDARD

(lavages)

Cholestérol mis en œuvre	SERIE I		SERIE II		SERIE III	
	Bichromate consommé	Cholestérol trouvé	Bichromate consommé	Cholestérol trouvé	Bichromate consommé	Cholestérol trouvé
mg.	cm3	mg.	cm3	mg.	cm3	mg.
0,25	0,604	0,36	0,596	0,35	0,424	0,26
0,50	1,260	0,75	1,202	0,71	0,849	0,50
0,75	1,628	0,97	1,515	0,90	1,272	0,76
1,00	1,970	1,15	1,903	1,13	1,675	0,99
1,50	2,627	1,56	2,672	1,59	2,509	1,49
2,00	3,386	2,02	3,386	2,02	3,294	1,96

Si nous considérons les courbes correspondant à ces nouveaux dosages nous voyons que :

1° La précipitation est toujours totale.

2° La surcharge plus forte que dans les précédents en raison du gros excès de digitonine employé, est maxima pour les petites quantités.

3° La courbe des chiffres après lavage est sensiblement confondue avec la courbe théorique.

DOSAGES DU CHOLESTEROL TOTAL D'UN LIQUIDE BIOLOGIQUE DANS DES CONDITIONS STANDARD

METHODE D'EXTRACTION

Nous avons extrait le cholestérol d'un échantillon de plasma par la méthode de Bloor Velluz que nous avons modifié légèrement.

Nous donnerons dans le chapitre V le détail de la technique employée.

SAPONIFICATION

Le cholestérol libre, qui seul peut se combiner au digitonoside ne représente qu'une fraction de 20 à 25 p. 100 du cholestérol total. Une saponification des esters de ce lipide est donc indispensable.

DUREE DE LA SAPONIFICATION

C'est une opération toujours longue et la durée varie suivant les auteurs dans des limites assez vastes.

Certains préconisent une saponification de 3 heures. DERRIEN et FONTÈS [22] estiment qu'elle ne doit pas dépasser 2 heures. Nous avons fait des étalonnages dans le temps et avons en effet remarqué qu'au delà de 2 heures le chiffre de cholestérol décroissait.

Durée de la saponification minutes	Cholestérol trouvé mg.
90	0,89
120	0,98
150	0,89

Ces dosages ont été faits sur un même échantillon d'HÉMOSTYL. Comme une saponification de 2 heures correspond au chiffre le plus fort nous concluons avec DERRIEN et FONTÈS que ce temps ne doit pas être dépassé.

Mode opératoire

L'extrait lipidique alcoolo éthéré provenant du sérum total ou déféqué suivant la technique de BLOOR VELLUZ est recueilli dans un ballon de 100 cm³ à large

col permettant l'adaptation d'un réfrigérant ascendant. On évapore à moitié volume pour chasser l'éther qui abaisserait le point d'ébullition du milieu. On ajoute 1 cm³ d'une solution alcoolique de potasse à 5 p. 100, une bille de verre au fond du ballon régularisera l'ébullition. Certains auteurs font la saponification en présence d'un très gros excès de potasse. Nous l'avons évité à dessein pour réduire au minimum les risques d'émulsion au cours de l'épuisement à l'éther qui va suivre.

La saponification achevée, le contenu du ballon est versé dans une ampoule à décantation. On lave le ballon encore chaud avec trois fois 3 cm³ d'alcool pour dissoudre le résidu qui peut adhérer au fond du ballon. Les épuisements à l'éther seront faits dans des conditions que nous définiront plus loin.

Le résultat de l'épuisement du produit de la saponification a été mis en solution dans 10 cm³ d'alcool à 95°.

C'est sur cette solution que nous avons effectué des dosages pour des prises différentes.

Prise correspondant à un volume de plasma de cm3	Quantité de Mél. sulfochromique réduit en cm3	Quantité de Cholestérol	
		trouvée par prise mg.	ramenée au litre g. par l.
0,40 cm3	0,849	0,50	1,250
0,60 cm3	1,226	0,73	1,219
0,80 cm3	1,970	0,98	1,220
1,00 cm3	2.087	1,24	1,240

En surajoutant à chaque prise 0 mg. 5 de cholestérol en solution alcoolique à 1 pour 1.000, nous retrouvons pratiquement la totalité du cholestérol.

Prise correspondant à un volume de plasma de	Quantité de Cholestérol en mg.		
	dosée dans le plasma seul	surajoutée	trouvée
0,40 cm3	0,50	0,50	0,99
0,60 cm3	0,73	0,50	1,26
0,80 cm3	0,98	0,50	1,47
1,00 cm3	1,24	0,50	1,75

CHAPITRE V

VALEUR DE QUELQUES MÉTHODES D'EXTRACTION DU CHOLESTÉROL DANS LE SANG

Bien qu'il ne soit pas dans nos intentions d'étudier ou de décrire toutes les méthodes d'extraction du cholestérol nous avons été amené au cours de nos essais à pratiquer différentes d'entre elles. Nous avons remarqué des écarts d'une méthode à l'autre.

Pesquier [17] avait fait une étude bibliographique détaillée de la plupart des méthodes d'extraction. Nous nous en sommes inspirés. Nous avons pratiqué celles qui nous paraissaient les plus simples, les plus commodes à réaliser avec un matériel courant tout en permettant une extraction maxima.

Extraction de Grigaut

PRINCIPE. — Si on traite le sérum par une solution éthéro-alcoolique alcaline, la couche éthérée surnageante contient la totalité du cholestérol du sérum.

TECHNIQUE. — Dans une ampoule à décantation de 60 cm³ type galactotimètre, on introduit dans l'ordre en mélangeant après chaque addition :

Sérum 2 cm³.

Alcool sodé 13 cm³.

(Alcool à 60 contenant 0,5 p. 100 de lessive de soude à 36° Bé.)

Ether ordinaire 15 cm³.

L'ouverture de la boule étant fermée on retourne deux fois l'appareil, la cholestérine passe dans l'éther. Après avoir abandonné au repos, pour obtenir la séparation des deux liquides, soutirer la couche inférieure et introduire dans l'appareil 20 cm³ d'eau environ en faisant couler le long des parois. Après 5 minutes de repos on soutire et on recommence l'opération avec 20 cm³ d'eau. Après un repos *d'au moins* 1 *heure* nouveau soutirage de façon à éliminer complètement le liquide aqueux. L'éther est évaporé à sec dans une capsule.

L'extrait lipidique ainsi obtenu renfermerait tout le cholestérol. De l'avis de beaucoup d'auteurs cette méthode n'est pas à utiliser.

Les travaux de Charonnat [18] montrent que l'extraction est incomplète.

Paget-Pierrart [19] en proposant une nouvelle formule de solvant d'extraction démontrent également l'infériorité de la méthode.

Méthodes d'extraction avec Soxhlet ou Kumagawa

Ces méthodes sont peu commodes, longues et se prêtent difficilement à l'extraction de faibles quantités de sérum ou de plasma. Certaines nécessitent l'emploi d'alcool absolu ou d'éther absolu séché sur sodium.

Nous avons considéré que c'était introduire dans notre méthode de dosage un facteur de complication

d'autant plus que nous disposons grâce à Bloor et Velluz d'une méthode infiniment plus commode et qui permet une extraction quasi totale du cholestérol.

Méthode de Bloor Velluz

Bloor et Velluz [20-21] utilisent un mélange d'alcool et d'éther à chaud.

TECHNIQUE DE VELLUZ (modification de la méthode de W. Bloor). — Dans une fiole jaugée de 100 cm^3 bouchant à l'émeri contenant 75 cm^3 d'un mélange alcool éther (3 parties d'alcool à 95° et 1 partie d'éther pur) on fait tomber goutte à goutte et en agitant, 5 cm^3 de sérum. On immerge la fiole dans un bain-marie chaud et on l'y maintient en l'agitant jusqu'au début de l'ébullition du contenu. Après avoir soigneusement refroidi puis complété à 100 cm^3 avec le même mélange alcool éther, on agite énergiquement et on filtre sur petit filtre plissé que l'on exprime légèrement en fin de filtration.

Le filtrat est recueilli dans une éprouvette de 100 cm^3 bouchée à l'émeri.

L'emploi de la fiole jaugée est ici rendu nécessaire parce que le liquide d'extraction servira à faire un dosage colorimétrique après évaporation et redissolution par le chloroforme.

Comme nous devons saponifier le cholestérol estérifié, l'emploi d'une fiole jaugée devient superflu à ce stade de l'opération. Nous avons légèrement modifié la technique. Voilà comment nous opérons.

Un gros tube cylindrique de centrifugeuse de 25 à à 30 cm^3 est rempli à moitié du mélange.

Alcool 3.

Ether 1.

Nous faisons tomber goutte à goutte le sérum, ou le plasma dans le mélange. Nous immergeons le tube dans

un bain-marie bouillant jusqu'à ébullition commençante en agitant de temps en temps à l'aide d'un agitateur. On centrifuge à vitesse maxima, quelques minutes. Le solvant est décanté. Nous épuisons encore deux fois le culot de centrifugation par mise en suspension dans un nouveau volume d'alcool éther de 10 à 15 cm³ et immersion au bain-marie comme plus haut. Après ce troisième épuisement, le sérum est pratiquement délipidé totalement. Les actions conjuguées du mélange alcool-éther et de la chaleur disloquent le support protéidique qui, dans notre méthode, est soumis trois fois à ce traitement. De plus, cette méthode est très rapide et il n'y a aucune perte par filtration. Elle ne nécessite aucun appareillage et l'on peut mener de front quatre extractions (quatre tubes dans une centrifugeuse normale).

Valeur de quelques méthodes d'extraction

Nature de l'échantillon traité	Prise	1o) Extraction Grigaut 2o) Saponification 3o) 3 épuisemts éther	1o) Extr. Bloor Vellus 2o) Saponification 3o) 3 épuisemts éther	1o) Echantill. total 2o) Saponification 3o) 3 épuisemts éther
Sérum total	2 cm3	0,91	0,98	0,99
Sér. déféqué	2 cm3	0,83	0,96	1.01

Ces essais ont été faits sur de l'Hémostyl Roussel, en ampoules de 10 cm³, provenant d'un même lot. La teneur en cholestérol dans toutes les ampoules est donc supposée identique.

Conclusions

Nous constatons que l'extraction sur défécat donne très sensiblement le même chiffre que l'extraction sur le sérum total.

Dans la méthode de GRIGAUT, le taux d'extraction est le plus faible. (D'accord avec PAGET-PIERRART et CHARONNAT).

Cette méthode est peu commode, surtout dans le cas où l'on ne dispose que d'un sérum défequé. En effet, le précipité dissous par 1 cm^3 de Na OH à 33° Bé donne une émulsion assez stable. La séparation des phases alcoolo-éthérées et aqueuses est lente.

Nous recommandons l'extraction suivant la méthode de BLOOR VELLUZ avant saponification. L'épuisement à l'éther est ainsi plus rapide.

CHAPITRE VI

RÉALISATION PRATIQUE D'UN DOSAGE

I. Extraction

a) *Cas d'un sérum ou d'un plasma total :*

Mettre dans un gros tube cylindrique de centrifugeuse de 30 à 35 cc de capacité :

15 à 20 cc d'un mélange

Alcool à 95° 3 volumes
Ether 1 volume.

Laisser tomber goutte à goutte le plasma ou le sérum dans ce mélange. Saisir le tube avec une pince en bois et le mettre dans un bain-marie bouillant. Agiter de temps en temps le mélange avec un agitateur et maintenir le tout jusqu'à ébullition commençante. Retirer aussitôt pour éviter que le contenu du tube ne déborde.

Centrifuger 3 à 4 minutes à vitesse maxima et décanter le mélange alcool éther dans un ballon de 100 cc à large col auquel on pourra adapter un réfrigérant ascendant.

Après décantation remettre le culot de centrifugation en suspension dans 20 cc de mélange alcool éther

et lui faire subir le même traitement que plus haut.

Répéter l'opération de façon à avoir fait trois extractions, et recueillir les trois portions de mélange alcool éther dans le ballon.

b) *Cas d'un sérum ou d'un plasma déféqué par le Tungstate de soude :*

Il peut être utile de doser sur un même plasma plusieurs éléments. C'est ainsi qu'un plasma déféqué peut permettre le dosage du glucose, de l'urée ou du chlore dans le défécat et un dosage de cholestérol dans le précipité. En effet, le précipité qui contient tous les lipides peut être extrait par la méthode de Bloor Vellüz. Nous recommandons le procédé suivant :

Dans une fiole jaugée de 20 cc mettre du sérum ou du plasma. Ajouter 5 cc d'eau, puis

Tungstate de soude à 10 p. 100 ... 1 cm³
Acide sulfurique 2 × N/3 ..... 1 cm³
Compléter à 20 cm³ avec de l'eau distillée.

Agiter. Verser le contenu de la fiole dans un gros tube de centrifugeuse. Centrifuger 3 à 4 minutes à vitesse maxima. Recueillir le défécat pour les dosages éventuels mentionnés ci-dessus.

La fiole est rincée 2 ou 3 fois avec de l'eau distillée. Verser le tout dans le tube de façon à recueillir la totalité du précipité. Centrifuger. Décanter. Traiter le culot comme un plasma total par mise en suspension et extraction.

II. Saponification

L'extrait éthéré de lipides est réduit par évaporation à 20 cc environ ; ajouter 1 cc d'une solution alcoolique à 5 % de potasse. Mettre 1 ou 2 billes de verre pour régulariser l'ébullition. Adapter un réfrigérant ascendant. Chauffer à feu nu mais à douce température (veilleuse d'un bec Bunsen) pendant 2 heures pour avoir une ébullition régulière.

III. Epuisement par l'éther

Le produit de la saponification après refroidissement est transvasé dans une ampoule à décantation de 100 à 150 cc.

Ajouter dans l'ordre : 20 cc d'éther.
30 cc d'eau.

Mélanger en retournant 3 à 4 fois l'ampoule après chaque addition. Eviter l'émulsion par agitation trop violente.

Après séparation, soutirer le liquide aqueux dans un bécher. Recueillir l'éther.

Epuiser encore deux fois le liquide aqueux par 10 cc d'éther chaque fois. Réunir les différentes portions d'éther et laver cet éther deux fois avec 20 cc d'eau.

Recueillir l'éther dans une capsule à bec de 25 à 30 cc de capacité : Evaporer dans un courant d'air ; terminer en amenant à sec à 100°.

Reprendre par l'alcool chaud l'extrait lipidique et verser dans une fiole jaugée de 10 cc. Rincer la capsule trois fois avec 2 cc d'alcool. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'alcool à 95°.

IV. Précipitation du complexe

Désireux de faire nos dosages en double, nous avons sur le conseil de notre maître, le professeur Thivolle fait les précipitations et la chromométrie sur deux prises que nous avons choisies inégales. (Par exemple, une prise correspondant à 0,4 cm^3 de plasma et une autre correspondant à 0,6 cm^3 de plasma, soit respectivement 2 et 3 cm^3 de la solution alcoolique d'extrait lipidique de plasma.)

La moyenne des deux chiffres donnera le résultat définitif.

Nous recommandons cette manière de faire qui

offre des garanties de précision supérieures aux dosages en double sur des prises semblables.

Ajouter dans chaque tube : 10 cc. de solution de digitonine à 4 p. 1.000 et 4 cc. d'acétone hydratée au 1/4.

Amorcer par frottement et attendre vingt minutes au moins en agitant de temps en temps. Centrifuger dix minutes. Décanter la solution surnageante avec une pipette d'Ambard. Laver une fois avec 2 ou 3 cc. de la solution de lavage. Recentrifuger dix minutes. Décanter.

V. Chromométrie du complexe

Evaporer les solvants complètement en mettant les tubes au bain-marie ou à l'étuve à 100° pendant dix minutes.

Ajouter 1 ou 2 cc. de mélange sulfochromique N/2 et une quantité d'acide sulfurique concentré pur équivalente pour que l'oxydation se fasse en présence de 70 % d'acide. Mélanger. Mettre au bain-marie bouillant pendant quinze minutes. Veiller en remuant de temps en temps avec un micro agitateur que l'on laisse dans le tube pendant toute la durée de l'opération, à ce qu'aucune parcelle de complexe n'échappe à l'oxydation.

Transvaser sans perte dans un Erlenmeyer de 150 cc. en lavant trois fois le tube. Amener le volume à 30-40 cc. Titrer en présence de 0,4 cc. de diphénylbenzidine avec du ferrocyanure de potassium $\frac{N}{80}$.

La quantité de mélange sulfochromique $\frac{N}{2}$ consommée, multipliée par 0,595, donne le poids de cholestérol titré dans la prise. Faire la moyenne entre les deux prises. L'écart ne doit pas être supérieur à 1 ou 2 %. Ramener au litre.

Cholestérol libre

La technique est identique. On supprime la saponification. Après l'extraction de Bloor-Velluz, on évapore l'extrait lipidique à sec dans une petite capsule. Le résidu est repris par l'alcool à chaud et versé dans une fiole de 10 cm^3. La précipitation est effectuée sur 3 et 5 cm^3.

CALCULS

Le coefficient 0,595 permet de calculer directement la quantité de cholestérol dosée à partir de la quantité de mélange sulfochromique réduite.

Nous avons établi ce coefficient d'après la courbe de la page 79 (série III) obtenue avec des échantillons de digitonine Uclaf et Merck. La concordance des résultats est très satisfaisante et nous n'avons remarqué aucune différence entre les deux échantillons utilisés.

CONCLUSIONS

A la suite de l'étude des différentes méthodes de microdosage du cholestérol par le complexe cholestérol-digitinoside, nous avons pu nous rendre compte que les techniques proposées jusqu'à présent étaient en général d'une exécution délicate et fort longue.

Dans le cas particulier des microdosages, la chromométrie appliquée par différents auteurs a mis en évidence l'intérêt de cette façon d'opérer plus sûre et plus rapide que la micropesée qui nécessite des instruments de pesée qui ne sont pas à la portée de tout laboratoire (microbalance au 1/1000e de milligramme). Les méthodes chromométriques pratiquées jusqu'à ce jour sont en général assez compliquées, d'une application pratique peu aisée par les moyens d'oxydation et les appareils spéciaux mis en œuvre.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de perfectionner la chromométrie du complexe en travaillant réellement à l'échelle microanalytique. Disposant d'une méthode de chromométrie microanalytique très simple et précise, nous avons pensé qu'il serait utile de l'appliquer au cas particulier du cholestérol.

Nos recherches ont à la fois porté sur la précipitation du complexe et sur son oxydation chromique.

PRECIPITATION

Solvant du Digitonoside

Les auteurs dans les diverses méthodes proposées jusqu'à ce jour pratiquent la précipitation à chaud dans des solvants de formules variées qui permettent de faire des solutions plus ou moins stables. Le problème est en effet assez délicat, tel solvant stable ne constituait pas un bon milieu de précipitation ou inversement et la mise en solution du digitonoside constitua un écueil fort gênant pour nos précurseurs.

Si, pour la précipitation à chaud, les possibilités d'utiliser différents corps étant à la fois un bon solvant de la digitonine et un mauvais solvant du complexe semblaient épuisées, nous avons, dans le domaine de la précipitation à froid, mis à profit de nouvelles possibilités.

Nous utilisons un mélange d'alcool et de chloroforme. L'addition d'acétate d'ammoniaque nous permet d'assurer la stabilité de la solution pendant un mois, à condition qu'elle soit conservée à l'abri de la lumière.

En raison de la rareté et de la chèreté de la digitonine, la récupération de ce produit nous semble indiquée. Nous avons dans notre travail indiqué la méthode permettant une récupération de 60 à 70 p. 100 de cette saponine.

Précipitation à froid

Les auteurs, jusqu'à présent, utilisèrent des techniques de précipitation à chaud. Dans ces conditions, les risques de perte par dissolution partielle du complexe sont assez difficiles à éviter. A l'échelle micro-analytique, ces risques sont augmentés et ce phénomène devient particulièrement gênant.

Nous proposons la précipitation à froid qui, à notre connaissance, n'a jamais été tentée. Elle offre de nom-

breux avantages que nous avons énumérés dans notre exposé.

Nous avons défini des conditions standard de précipitation permettant le dosage de quantités de cholestérol allant de 0,25 mgr. à 2 mgr. avec une précision de l'ordre de 1 à 2 p. 100. L'amorçage de la précipitation se fait par frottement.

Nous avons supprimé les pertes de complexe par transvasement en gardant dans un même tube le microprécipité de complexe dès sa naissance jusqu'au terme final de l'oxydation chromique.

Pour la séparation du complexe et son lavage, nous avons recours à la centrifugation, seule manière, à notre avis, de manipuler un microprécipité de l'ordre d'un milligramme.

Employant pour la purification du complexe uniquement des solvants volatils, la dessication totale du complexe est très rapide et se fait en dix minutes à 100°. Nous évitons ainsi une perte de temps en supprimant un long séjour (1 heure pour certaines techniques) à l'étuve à 100°.

CHROMOMETRIE

Nous avons abordé le problème de la chromométrie du complexe en le décomposant en ses deux constituants

1° La chromométrie du cholestérol pur ;

2° La chromométrie du digitonoside pur.

La technique chromométrique de Thivolle et Sonntag nous a permis de simplifier notre dosage sans préjudice à la précision.

Nous inspirant des applications récentes de ces deux auteurs de la chromométrie directe, nous avons, sans précautions spéciales et en utilisant exclusivement un matériel des plus courants, pu faire une oxydation

chromique de courte durée. Malgré cela, nous avons, et grâce au fort pouvoir oxydant de la solution sulfochromique employée (N/2 50 p. 100 de SO^4H^2) atteint un stade d'oxydation assez avancé et sûr. Le degré d'oxydation obtenu est à peine inférieur à celui obtenu par nos précurseurs qui, dans leurs méthodes, mettent en œuvre des moyens plus énergiques et peu commodes. (Appareils spéciaux, température élevée, longue durée d'oxydation.)

Les étalonnages du cholestérol, du digitonoside et du complexe, base de la chromométrie du complexe, ont tous été faits sur des solutions de titre déterminé après évaporation.

La mesure d'une solution étant plus aisée et plus précise, nous avons pu opérer sur des quantités très variables de matériel à oxyder en évitant à cette échelle les difficultés d'une pesée.

Nous avons constaté que les propriétés réductrices du cholestérol et du digitonoside n'étaient pas additives dans le complexe.

EPUISEMENT DU CHOLESTEROL

Plusieurs essais pour connaître la valeur de quelques méthodes d'épuisement du plasma ou du sérum nous ont amené à fixer notre choix sur la méthode d'extraction selon Bloor-Velluz. La méthode fort simple permet un épuisement maximum dans un temps minimum (quinze minutes). Tout en respectant le principe, nous l'avons légèrement modifié dans sa technique. La centrifugation, là encore, nous permet de séparer sans pertes le précipité lipidoprotidique après chacun des trois épuisements à chaud que nous lui imposons. La technique adoptée permet l'épuisement soit du plasma total, soit du précipité obtenu après défécation tungstique, si sur le même échantillon on veut pratiquer d'autres dosages (glucose, chlore, urée).

La prise d'essai optima que nous utilisons est 2 cm³ de plasma ou de sérum ou le précipité tungstique correspondant. Si l'on ne dispose que de 1 cm³ de liquide biologique, les opérations sont les mêmes, la précipitation devant cependant se faire sur des prises d'essai doubles de la solution alcoolique d'extrait lipidique saponifié.

SAPONIFICATION

Nous avons fait une saponification de deux heures telle qu'elle a été proposée par FONTES. Pour les conditions dans lesquelles nous opérons, les chiffres sont maxima pour une saponification de deux heures en présence de 1 cm³ d'une solution de potasse à 5 p. 100 dans l'alcool à 95°.

La saponification se fait sur le mélange éthéro-alcoolique résultant de l'épuisement suivant la méthode de BLOOR-VELLUZ. Chasser l'éther avant la saponification pour ne pas abaisser trop la température d'ébullition du mélange. L'opération se fait dans un ballon de 100 cm³ surmonté d'un réfrigérant ascendant.

DURÉE TOTALE DE L'OPERATION

Nous comptons pour l'extraction de BLOOR-VELLUZ	15 minutes
La saponification	120 minutes
L'épuisement à l'éther, l'évaporation et la reprise par l'alcool	15 minutes
Précipitations et lavages	30 minutes
Evaporation des solvants	10 minutes
Oxydation chromique	15 minutes
Titrage	5 minutes
	210 minutes

La durée minima d'un tel dosage est de 3 heures et demie, la saponification intervenant pour 2 heures.

La technique se prête à des microdosages en série.

VALEUR DES RESULTATS OBTENUS

L'erreur obtenue n'est pas supérieure à 2 p. 100. Quelques dosages particulièrement heureux nous ont donné moins de 1 p. 100. La phase la plus délicate du microdosage, c'est-à-dire la précipitation est toujours faite en double sur des prises inégales suivant une discipline qui nous fut conseillée par notre maître le professeur THIVOLLE.

Clermont-Ferrand, le 10 juillet 1942.

VU :

Le Président du Jury,

P. CORDIER.

Clermont-Ferrand, le 12 juillet 1942.

VU ET APPROUVÉ :

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

A. SARTORY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Clermont-Ferrand, le 15 juillet 1942.

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,

Pour le Recteur,
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,

A. DANJON.

BIBLIOGRAPHIE

(1) PAGET et PIERRART. — Contribution à l'étude du dosage du cholestérol sanguin. Recherche sur la précipitation du complexe cholestérol digitonoside en milieu hydro-acétono-trichloréthylénique. *C. R. Soc. Biol.* 1937. CXXV, 654.

(2) MILDBRADT. — *H. S.*, 182.

(3) WINDAUS. — Ueber die Quantitative Bestimmung des Cholesterin und der Cholesterinester. *Zeit Phys. Chem.* 1910, 65, 110.

(4) DOURIS. — Guide Pratique pour l'examen et l'analyse du sang. Vigot Frères, 1939. Paris.

(5) FLEURY. — *Fiches techniques de Chimie Biologique.* Editions Vega. Paris 1933.

(6) LIFTSCHUTZ cité par GOFFINET et REDING. — Méthode nouvelle de dosage de la cholestérine par la Digitonine. *C. R. Soc. Biol.* 1935, 118, 1.481.

(7) BANG. — *Biochem. Zeitschr.* 1918, 91, 86.

(8) SZENT GIORGYI. — Die Titrimetrische Mikrocholesterinbestimmung. *Bioch. Zeit.* 1923, 136, 112.

(9) KAISER MATHIEU. — Technique de dosage du cholestérol par oxydation chromique. *Soc. Chim.* 1939, 6, 715.

(10) CORDEBARD. — Vérification de la pureté et titrage des composés organiques complètement oxydés par le mélange chromique. *Thèse doctorat en Pharmacie*, Nancy 1922.

— Le dosage titrimétrique des substances organiques par oxydation chromique. Emploi de liqueurs titrées stables : les solutions nitrochromiques. *J. Pharm. et Chim.* 1939, 30, 263-272.

— L'oxydation chromique en analyse quantitative. 1941.

(11) THIVOLLE et SONNTAG. — La chromométrie et ses applications micro-analytiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1939, 19, 1.353, 1.367.

— *La Documentation du Biologiste Praticien.* 1942, page 28.

(11') THIVOLLE et SONNTAG. — La chromométrie et ses applications microanalytiques. I) Microdosage du potassium. II) Microdosage de l'urée sanguine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1941, 23, 1.296, 1.310.

(12) NICLOUX. — Dosage de l'alcool dans les dilutions où cet alcool est dilué dans des proportions comprises entre 1/500e et 1/3000e *C. R. Soc. Biol.* 1896, 48, 126.

— Dosage et distillation de traces d'alcool éthylique. Application au dosage dans le sang, l'urine et les tissus. *C. R. Soc. Biol.* 1913, 74, 267.

(13) IONESCO, MATIU et POPESCO. — Une modification de la méthode de Nicloux pour le microdosage de l'alcool éthylique. Emploi d'un indicateur. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1937, 19, 911, 921.

(14) POLONOWSKI. — Microdosage des substances réductrices. Indice chromique. *C. R. Soc. Biol.* 1922, 86, 853, 855.

(15) LEULIER (A.) — Le Potassium. Microdosage, Fixation, Répartition. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1933, 15, 1588, 202.

(16) CAMINADE. — Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1922, 4, 518 et 601.

(17) PESQUIER. — Pouvoir cholestérolytique et ses rapports avec certains constituants du sang. *Thèse Dr. Pharmacie*, Faculté Pharmacie de Strasbourg. Année 1936-1937.

(18) CHARONNAT. — Les substances libérant le cholestérol de son support protéique. *J. P. C.* 1936, 1.307.

(19) PAGET et PIERRAT. — Nouvelle méthode d'extraction du cholestérol. *B. S. C. B.* 1939, 21, 539.

(20) W. R. BLOOR. — *Journ. of Biol. Chim.* 1916, 112, t. 27, 107.

(21) VELLUZ. — *Soc. Biol.* 1933, 112, p. 255.

(22) DERRIEN et FONTES. — *Chimie Biologique Médicale.* Librairie J. B. Baillère et Fils. Paris 1931.

(23) OKEY. — *Journ. Biol. Chem.* 1930, 88, 367.

(24) YASUDA. — *Journ. Biol. Chem.* 1931, 92, 303.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 13

LE CHOLESTÉROL DANS LE SANG 15

CHAPITRE I

LES METHODES GENERALES DE DOSAGE DU CHOLESTEROL

Les dosages colorimétriques (19). Les dosages par le complexe cholestérol-digitonoside (21). Les dosages pondéraux (22). Les dosages volumétriques (22). Critique des divers types de dosage (23).

CHAPITRE II

GENERALITES SUR LA CHROMOMETRIE

Généralités (27). Conditions à remplir (28). Application en chimie biologique (29). Technique de la chromométrie (29). Solutions oxydantes employées (29). Réactif nitrochromique (30). Réactif sulfochromique (30). Titrage des solutions chromiques (32). Généralités sur le titrage (32). Valeur des différentes méthodes (33). La chromométrie directe de THIVOLLE et SONNTAG (34). Choix d'un réducteur (35). Préparation du ferrocyanure N/80 (35). Préparation de la diphénylbenzidine (36). Titres des solutions (37). Réalisation d'un dosage chromométrique (38). Quelques généralités sur le dosage chromométrique des lipides (39).

CHAPITRE III

LA CHROMOMETRIE DU COMPLEXE CHOLESTEROL-DIGITONOSIDE

Chromométrie du cholestérol pur (44). Chromométrie du digitonoside pur (49). Chromométrie du complexe (52).

Chapitre IV

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION DU COMPLEXE CHOLESTEROL-DIGITONOSIDE

Techniques de Windaus (57), de Caminade (58), de Paget-Pierrart (59). Nécessité de trouver une nouvelle méthode de précipitation (60). Précipitation à froid du complexe (61). Avantages d'une précipitation à froid (62). Technique de la précipitation à froid et amorçage (62). Conditions nécessaires à une précipitation à froid, excès de digitonine non lavé (65). Lavages du complexe (66). Composition du milieu précipitant (68). Rôle de l'acétate d'ammoniaque comme agent de stabilité (69). Préparation de la solution de digitonine (70). Mode opératoire pour précipiter des quantités de cholestérol allant de 0,25 à 2 milligrammes (71). Séparation du complexe (71). Lavages du complexe (71). Évaporation des résidus de solvant après décantation (72). Préparation du complexe destiné à la saturation du solvant de lavage (72). Récupération de la digitonine (73). Précipitation avec un petit excès de digitonine, complexe non lavé (74), tableau (75). Précipitation avec un grand excès de digitonine, conditions standard avec lavages (78), tableau (80). Dosage du cholestérol total d'un liquide biologique dans des conditions standard (80).

Chapitre V

VALEUR DE QUELQUES METHODES D'EXTRACTION DU CHOLESTEROL DANS LE SANG

Extraction de Grigaut (85). Extraction de Bloor-Velluz (87).

Chapitre VI

REALISATION PRATIQUE D'UN DOSAGE

Extraction. — 1° Cas d'un sérum ou d'un plasma total (91) ; 2° Cas d'un sérum ou d'un plasma déféqué par le tungstate de soude (92). Saponification (92). Epuisement par l'éther (93). Précipitation du complexe (93). Chromométrie du complexe (94). Calculs (95).

Conclusions 97

Bibliographie 103